

Aus dem Institut  
für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie  
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

---

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. K. Schrör

Regulation der Expression  
der löslichen  
Guanylatzyklase durch  
Stickstoffmonoxid

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Michèle François  
(2009)

**„ Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen  
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf “**

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf  
Dekan

Referent: Prof. Dr. Kojda

Koreferent: Prof. Dr. Gödecke

**Mündliche Prüfungen:**

05. März 2010: Prof. Dr. G. Kojda, Institut für Pharmakologie und  
Klinische Pharmakologie, Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf

05. März 2010: Prof. Dr. A. Gödecke, Institut für Herz und Kreislauf-  
Physiologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

05. März 2010: Prof. Dr. V. Kolb-Bachofen, Institut für Immunbiologie,  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

## Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Die NO-Biosynthese und die Isoformen der NO-Synthase	1
1.2	Exogenes Stickstoffmonoxid (NO)	6
1.3	Das endogene Stickstoffmonoxid (NO), seine physiologischen und pathophysiologischen Eigenschaften	8
1.4	Der NO•-cGMP-Signaltransduktionsweg	9
1.5	Die lösliche Guanylatzyklase (sGC)	11
1.6	Fragestellung	15
2.	Material und Methode	16
2.1	Materialien	16
2.1.1	Substanzen und Chemikalien	16
2.1.2	Lösungen und Puffer	17
2.1.3	Geräte	18
2.2	Methoden	19
2.2.1	Zellkultur	19
2.2.2	Allgemeine Bedingungen für die Zellkultur	19
2.2.3	Klonierung des WT-Vektors bzw. des leeren Vektors	20
2.2.3.1	Transformation und Kultivierung von <i>E. coli</i>	20
2.2.3.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> -Zellen	21
2.2.3.3	DNA-Restriktion, und DNA-Auftrennung	22
2.2.3.4	DNA-Isolation und DNA-Reinigung	23
2.2.3.5	DNA-Linearisierung und DNA-Ligation	23
2.2.4	Stabile Transfektion in HEK 293 Zellen	23
2.2.5	Inkubation der HEK 293 Zellen mit DETA/NO	24
2.2.6	PCR (Polymerasekettenreaktion)	25
2.2.7	Präparation und Analyse von RNA aus HEK 293 Zellen in der RT-PCR	26
2.2.7.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus HEK 293 Zellen	26
2.2.7.2	RT-PCR (Reverse Transkriptase-PCR) und kompetitive RT-PCR	28
2.2.7.3	Generierung des internen Standard-RNA- Fragmentes	29
2.2.8	Gewinnung von Zellhomogenaten	30
2.2.9	Gewinnung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) aus HEK 293 Zellen	30
2.2.10	Bestimmung der spezifischen Aktivität der endothelialen NO-Synthase	31

2.2.11	Präparation der Aortensegmente von Ratten	32
2.2.12	Inkubation der Aortensegmente mit SPER/NO	33
2.2.13	Herstellung einer zytosolischen Fraktion aus Aortensegmenten und Proteinbestimmung	33
2.2.14	Bestimmung der spezifischen Aktivität der löslichen Guanylatzyklase	34
2.2.15	Bestimmung der Expression der löslichen Guanylatzyklase (sGC)	35
2.2.16	Statistik	37
3.	Ergebnisse	38
3.1	Expression von WT-eNOS in HEK 293 Zellen	38
3.2	Einfluss von NO auf die mRNA-Expression der löslichen Guanylatzyklase	38
3.2.1	mRNA-Expression der sGC in normalen HEK 293 Zellen	39
3.2.2	mRNA-Expression der sGC in DETA/NO inkubierten HEK 293 Zellen	40
3.2.3	mRNA-Expression der sGC in vektor-transfizierten HEK 293 Zellen	41
3.2.4	mRNA-Expression der sGC in eNOS-transfizierten HEK 293 Zellen	42
	Messung der Aktivität gereinigter WT-eNOS	42
3.3	Einfluss von NO auf die m-RNA-Expression in verschiedenen Zellen	43
3.4	Einfluss von NO auf die Aktivität der löslichen Guanylatzyklase	44
3.5	Einfluss von NO auf die Expression der löslichen Guanylatzyklase	45
4.	Diskussion	46
4.1	Diskussion der Methodik	46
4.1.1	kompetitive RT-PCR	46
4.1.2	Western-Blot	49
4.1.3	Aktivitätsbestimmung	50
4.2	Diskussion der Ergebnisse	51
5.	Zusammenfassung	65
6.	Literaturverzeichnis	66
7.	Publikation	76
8.	Lebenslauf	77
9.	Danksagung	78

## Abkürzungsverzeichnis

ADMA	asymmetrisches Dimethylarginin
BH <sub>4</sub>	5, 6, 7, 8-Tetrahydro-L-Biopterin
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum Albumin (bovine serum albumin)
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
CaM	Calmodulin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre (kopierte) DNA
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CO	Kohlenmonoxid
DEAE	Diethylaminoethan
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DETA	(Z)-1-[N-(2-aminoethyl)-N-(2-ammonioethyl)amino]diazene-1-ium-1,2-diolate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotide
DTT	DL-Dithiothreitol
EIA	Enzymimmunoassay
EDRF	Endothelium-Derived-Relaxing-Factor
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
eNOS	endotheliale NO-Synthase
FAD	Flavinadenindinukleotid
FBS	fötales Rinderserum (fetal bovine serum)
Fe <sup>2+</sup>	Eisen

FMN	Flavinadeninmononukleotid= Riboflavin-5 '-monophosphat
GMP	Guanosinmonophosphat
G418-Sulfat	Geneticin-Sulfat, Antibiotikum, C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> N <sub>4</sub> O <sub>10</sub>
GSNO	S-Nitro-Glutathion
GTN	Glyceroltrinitrat (Nitroglycerin)
GTP	Guanosintriphosphat
HEK	humane embryonale Nierenzellen
His	Histidin
Hsp90	Hitzeschockprotein 90
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
INF- $\gamma$	Interferon $\gamma$
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
IRAG	IP <sub>3</sub> Rezeptor assoziiertes cGMP (G)-Kinase Substrat
ISDN	Isosorbiddinitrat
ISMN	Isosorbid-Mononitrat
IS-5-N	Isosorbid-5-Mononitrat
K <sup>+</sup>	Kalium
Kac	Kaliumacetat
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani Vollmedium
LDL	Low density protein
L-NAME	N $\omega$ -Nitro-L-Argininmethylester
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium
Mn <sup>2+</sup>	Mangan
MMuLV	Moloney Murine Leukemia Virus

MOPS	3-N-Morpholino-propansulfonsäure
mRNA	Messenger RNA
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NGF	Nerve-growth-factor
NOS	NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NO•	Stickstoffmonoxid-Radikal
nNOS	neuronale NO-Synthase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate-buffered saline)
pcDNA3	Vektor zur Transfektion in HEK Zellen
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
PDE	Phosphodiesterase
PETN	Pentaerithrithyltetranitrat
PK	Proteinkinasen
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
REA	Reaktionsgemisch
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonukleinase
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse-Transcription-Polymerase chain reaction
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standard error of mean (Standardfehler des Mittelwertes)
SERCA	sarkoplasmatische-Retikulum-ATPasen



sGC	lösliche (soluble) Guanylatzyklase
SNAP	racem. S-Nitroso-N-Acetylpenicillamin
SNP	Sodium-Nitroprussid
SPER	Z-1-{N-[3-Aminopropyl]-N-[4-(3- Aminopropyl-ammino)-butyl]-amino}-diazen-1-ium-11,2diolat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBST	Tris-Natrium-Tween
TEA	Triethanolamin
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N'N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TNF $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$
VASP	vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein
WT	Wildtyp
YC-1	3'-(5'-Hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzylindazol

## **1. Einleitung**

1980 entdeckten Furchgott und Zawadki die endothelabhängige Relaxation durch einen von den Endothelzellen in den Gefäßwänden gebildeten Faktor und nannten diesen „EDRF“ (endothelium derived relaxing factor). Sieben Jahre später wurde von mehreren Arbeitsgruppen unabhängig voneinander festgestellt, dass der EDRF mit dem Stickstoffmonoxid (NO) identisch ist (Ignarro et al., 1987; Khan & Furchgott, 1987; Palmer et al., 1987; Kelm et al., 1988). Die Aufklärung der physiologischen Bedeutung von NO stellte und stellt eine große wissenschaftliche Herausforderung dar. Neben seiner relaxierenden Wirkung auf glatte Muskelzellen und seiner blutdruckregulierenden Eigenschaft, konnte gezeigt werden, dass NO in zahlreiche biologische Prozesse eingebunden ist. NO fungiert als „unspezifischer“ Neurotransmitter, als Modulator der Zellproliferation, als Immunregulator bei inflammatorischen Prozessen und wirkt zytostatisch auf Tumorzellen durch Induktion der Apoptose (Moncada & Higgs, 1993; Nussler & Billiar, 1993; Kröncke et al., 1995). Für die Entdeckung der Rolle von „NO als Signalmolekül im kardiovaskulären System“ erhielten Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro und Ferid Murad 1998 den Nobelpreis für Medizin. Feelisch & Noack (1987) entdeckten, dass NO den gemeinsamen, biologisch aktiven Wirkstoff aller Nitrovasodilatoren darstellt. Demnach spielt NO auch eine Rolle in der Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen wie z.B. akute Herzinsuffizienz, koronare Herzerkrankung (KHK).

### **1.1 Die NO-Biosynthese und die Isoformen der NO-Synthase**

Die Biosynthese von NO verläuft über eine oxydoreduktive Umsetzung der basischen Aminosäure L-Arginin zu Citrullin und zum Stickstoffmonoxid-Radikal (NO•) (Palmer et al., 1988; Schmidt et al., 1988). Diese Reaktion wird von der NO-Synthase (NOS) katalysiert (Bredt & Synder, 1990). An dieser Reaktion sind zahlreiche Kofaktoren wie NADPH (Nicotinamidadenindinukleotidphosphat), FAD (Flavinadenindinukleotid) und FMN (Flavinadeninmononukleotid) sowie BH<sub>4</sub> (5, 6, 7, 8-Tetrahydro-L-biopterin), eine Hämgruppe und Ca<sup>2+</sup>/CaM (Kalzium-Calmodulin- Komplex) beteiligt (Mülsch et al., 1989).

Heute sind 3 Isoformen der NO-Synthase bekannt, die endotheliale (eNOS), die neuronale (nNOS) und die induzierbare (iNOS) NO-Synthase (Moncada & Higgs, 1993). Aufgrund ihrer Eigenschaften kann man sie in 2 Gruppen einteilen: einerseits solche, die konstitutiv exprimiert werden und  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-abhängig sind (Palmer et al., 1988), andererseits solche, die Zytokin-induzierbar sind und  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-unabhängig reguliert werden (Stuehr & Nathan, 1989). Zur ersten Gruppe gehören die neuronale NOS (nNOS/NOS I) und die endotheliale NOS (eNOS/NOS III). Zur zweiten Gruppe gehört die, ursprünglich aus Makrophagen isolierte und erst durch Entzündungsmediatoren aktivierte, induzierbare NOS (iNOS/NOS II).

Die iNOS ist überwiegend im Zytosol lokalisiert und produziert NO in mikromolarer Konzentration. Sie bindet bereits bei sehr niedrigen Kalziumkonzentrationen  $\text{Ca}^{2+}$ -freies Calmodulin (CaM), ihre Aktivität ist *in vivo* nicht von Veränderungen des intrazellulären Kalziumspiegels abhängig (Nathan & Xie, 1994a).

Man kann die iNOS in verschiedenen Zelltypen wie z.B. Makrophagen, Hepatozyten, Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Astrozyten finden (Nathan, 1992).

Die Expression der iNOS wird erst bei Entzündungen oder Infektionen durch Zytokine wie z.B. Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-1 $\beta$  oder auch durch Endotoxine wie z.B. bakterielles Lipopolysaccharid stimuliert (Pfeiffer et al., 1999). Einmal induziert, produziert die iNOS über mehrere Stunden bis Tage NO in sehr hohen Konzentrationen, bis 1000-fach höhere als bei den konstitutiv exprimierten NO-Synthasen. Die hohen NO-Konzentrationen wirken zytotoxisch oder zumindest antiproliferativ auf Mikroorganismen wie Bakterien, Viren oder Parasiten. Sie spielt daher eine Rolle bei der Immunabwehr. Pathophysiologisch scheint die Expression der iNOS vor allem im kardiovaskulären System eine Bedeutung zu haben. Im septischen Schock kommt es zur Expression der iNOS, die zur massiven, katecholaminresistenten Vasodilatation mit dramatischem Abfall des peripheren Gefäßwiderstands (Moncada & Higgs, 1991; Gross & Wolin, 1995; Bhagat & Vallance, 1996) führt. Buttery et al. (1996) konnten die iNOS in menschlichen, atherosklerotisch veränderten Gefäßen nachweisen. In diesen atherosklerotischen Läsionen kommt es zu Veränderungen des oxydativen Gefäßwandstatus.

In dieser Arbeit interessierten vor allem die konstitutiv exprimierten NO-Synthasen, insbesondere die eNOS.

Die beiden konstitutiv exprimierten NO-Synthasen, nNOS und eNOS, haben beide einen membrangebundenen Teil und produzieren NO in nanomolaren Konzentrationen. Sie werden zum Teil über die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Zytosol reguliert (Nathan & Xie, 1994a). An die CaM-Bindungsstelle der NO-Synthase kann nur CaM andocken, das bereits an Kalzium gebunden ist (Lamas et al., 1992). Ein Anstieg der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von über 100 nM ist ausreichend um die nNOS und die eNOS zu aktivieren.

Die **nNOS** wird in Neuronen des Gehirns und im peripheren Nervensystem (PNS) (Bredt & Synder, 1989), sowie in Skelettmuskelzellen, Lungenepithelzellen und der Macula densa der Niere exprimiert. NO wirkt im Nervensystem bei der Entstehung des Langzeitgedächtnisses mit. Im PNS wirkt NO als Neurotransmitter und spielt somit in der Regulation von Organen, die überwiegend glatte Muskelzellen besitzen, eine Rolle (z.B. im Gastrointestinaltrakt, Urogenital- und Respirationstrakt sowie in den Blutgefäßen) (Pfeiffer et al., 1999).

Die **eNOS** wird überwiegend in Endothelzellen aber auch in Thrombozyten, Herzmuskelzellen und einzelnen Strukturen des zentralen Nervensystems (ZNS) exprimiert. Die Regulation der eNOS-Expression wird durch viele Faktoren beeinflusst und ist sowohl von der Genaktivität als auch von der Stabilität der mRNA abhängig. So konnten Nishida et al. (1992) zeigen, dass mechanische Dehnung, hohe Scherkräfte im Gefäßsystem („shear stress“) oder die Hemmung bzw. Herunterregulierung von Proteinkinase C (PKC) die eNOS in den Endothelzellen stimuliert. Auch niedrige Konzentrationen von oxidiertem Low-density-protein (LDL), cGMP-Analoga, Statine (Medikamente, die die Cholesterinsynthese hemmen) und körperliche Bewegung führen zu einer Steigerung der eNOS-Expression. Durch Wasserstoffperoxid- (Drummond et al., 2000) und Östrogen-Gabe (Tan et al., 1999) kommt es ebenfalls zu einer Steigerung der Transkription. Der wichtigste Regulationsmechanismus ist die negative Rückkopplung durch  $\text{NO}\bullet$  selbst. Liegt  $\text{NO}\bullet$  im Überschuss vor, bindet es an das  $\text{Fe}^{2+}$  der Häm-Gruppe und hemmt so die eNOS.

Die Affinität des Häm-Eisens zum  $\text{NO}\bullet$  ist größer als die zum Sauerstoff ( $\text{O}_2$ ), so dass  $\text{NO}\bullet$  bis zu 80-90 % der eNOS-Aktivität inhibieren kann (Abu-Soud et al., 1995).

Bei einer bestehenden Hypoxie wird die Transkription des eNOS-Gens gehemmt und es kommt zur eNOS-Inhibition (McQuillan et al., 1994). Der TNF- $\alpha$  sowie hohe Konzentrationen an oxidiertem LDL bewirken einen schnellen mRNA-Abbau und es kommt ebenfalls zur Hemmung der eNOS-Aktivität. Methylierte Analoge von L-Arginin werden als endogen vorkommende Inhibitoren der NO-Synthase beschrieben; die größte Bedeutung kommt dabei dem asymmetrischen Dimethylarginin (ADMA) sowie dem NG-monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) zu.

Die 3 Isoformen der NO-Synthase unterscheiden sich durch ihre zelluläre Lokalisation, ihre katalytischen Eigenschaften, ihre Gewebsspezifität (**Tabelle 1**).

	nNOS	iNOS	eNOS
Molekulargewicht (kDa)	160	130	135
Eigenschaften	konstitutiv	induzierbar	konstitutiv
Aktivierung	Ca <sup>2+</sup> /CaM-abhängig	Ca <sup>2+</sup> /CaM-unabhängig	Ca <sup>2+</sup> /CaM-abhängig
zelluläre Lokalisation	membran-gebunden	zytosolisch	membran-gebunden
Vorkommen	neuronale Zellen im ZNS und PNS, Skelettmuskelzellen	Makrophagen, Hepatozyten, Kupffersche Zellen, glatte Muskelzellen, Astrozyten, $\beta$ -Zellen des Pankreas u.v.a.	Endothelzellen, Epithelzellen, Kardiomyozyten, Thrombozyten
Antwort auf Stimulus	kurzzeitige Freisetzung (Sekunden)	langfristige Freisetzung (Stunden/Tage)	kurzzeitige Freisetzung (Sekunden)
Freisetzungsmenge	NO-Freisetzung im Nanomolarbereich	NO-Freisetzung im Micromolarbereich	NO-Freisetzung im Nanomolarbereich

**Tabelle 1** Überblick über die Isoenzyme der NO-Synthase (aus Pfeiffer et al., 1999)

Alle 3 Isoformen der NO-Synthase haben eine homodimere Struktur. Jede Untereinheit besteht aus einer N-terminalen Oxygenasedomäne und aus einer C-terminalen Reduktasedomäne. (**Abb. 1**)

Die Oxygenasedomäne besitzt eine Hämgruppe und je eine Bindungsstelle für den Kofaktor BH<sub>4</sub> und das Substrat L-Arginin. Die Reduktasedomäne enthält ein Molekül FAD und ein Molekül FMN und kann NADPH binden und so Elektronen über FAD und FMN auf die Hämgruppe der Oxygenasedomäne übertragen. Dafür ist jedoch die Bindung an Calmodulin notwendig, das den Elektronenfluss von NADPH zu den beiden Flavinen und zwischen den beiden Domänen erleichtert (Abu-Soud & Stuehr, 1993).

Zwischen der Oxygenasedomäne und der Reduktasedomäne befindet sich die Bindungsstelle für CaM (Bredt et al., 1991). Die Reduktion des Eisenatoms der Hämgruppe von  $\text{Fe}^{3+}$  zu  $\text{Fe}^{2+}$  ermöglicht die Bindung des Sauerstoffmoleküls. Ein weiterer Kofaktor ist das  $\text{BH}_4$ , das die NOS allosterisch aktiviert und zur Stabilisierung ihrer Struktur während der Katalyse beiträgt (Pfeiffer et al., 1999). Als Substrat dient L-Arginin, das in einer Reaktion mit dem Zwischenprodukt  $\text{N}^\omega$ -Hydroxyl-L-Arginin zu L-Citrullin und  $\text{NO}\cdot$  umgesetzt wird (Abb. 2).

Bei dieser Reaktion werden 5 Elektronen übertragen, 2 Elektronen von 1 Mol  $\text{O}_2$  und 3 Elektronen von 1,5 Mol NADPH (Marletta, 1993).

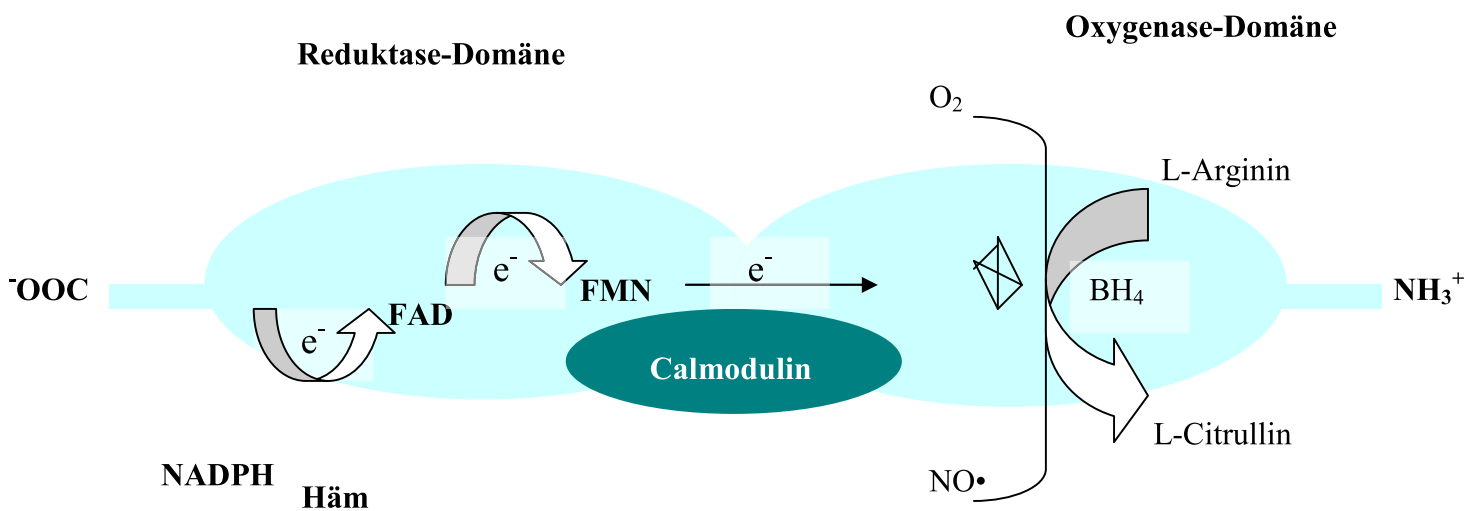


Abb. 1 Schematische Darstellung der NO-Synthase (übernommen aus Pfeiffer et al., 1999)

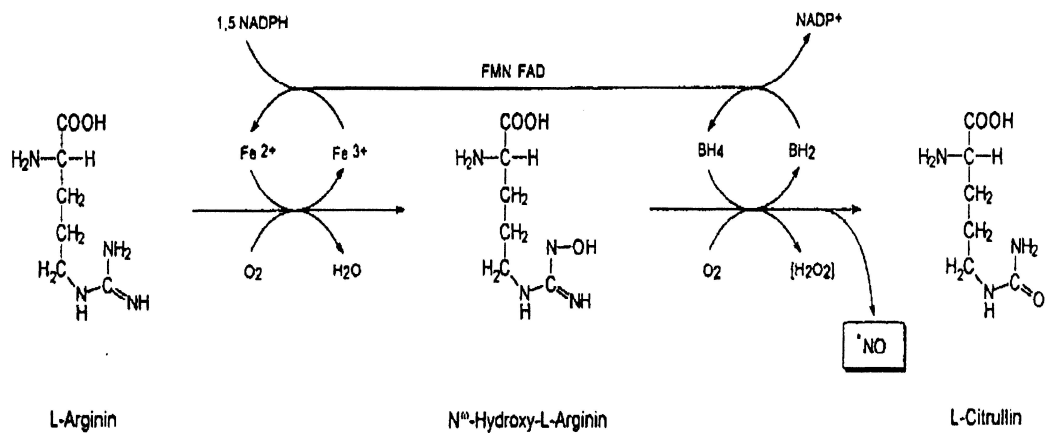


Abb. 2 Biosynthese von Stickstoffmonoxid L-Arginin zu Citrullin und  $\text{NO}\cdot$  (aus Hacker, 1999)

## 1.2 Exogenes Stickstoffmonoxid (NO)

NO ist ein gasförmiges, kleines (30 Da) Molekül, das bei Luftkontakt schnell bräunlich wird und im wässrigen Milieu nur gering löslich ist.

NO ist auch Bestandteil von Zigarettenrauch und Autoabgasen und kann toxisch wirken. Die Verbindung eines Stickstoffatoms mit einem Sauerstoffatom ergibt ein Produkt „Stickstoffoxid“ mit einem ungepaarten Elektron, weshalb NO ein Radikal ist. Seine Halbwertszeit beträgt zwischen 6 und 30 Sekunden (Malinski et al., 1993).

Die erste Beschreibung von exogen zugeführtem NO über das Pharmakon Nitroglycerin (GTN) stammt aus dem Jahre 1879. Organische Nitrate werden seit längerer Zeit zur Behandlung der koronaren Herzerkrankung (KHK) eingesetzt. Auch heute noch werden organische Nitrate wie Nitroglycerin (GTN), Isosorbid-5-Mononitrat (IS-5-N), Isosorbiddinitrat (ISDN) und Pentaerithrithyltetranitrat (PETN) zur Behandlung einer Myokardischämie, Angina pectoris und dekompensierter Herzinsuffizienz eingesetzt.

Chemisch gesehen handelt es sich bei diesen Arzneistoffen um Ester der Salpetersäure wie z.B. Amylnitrit oder anorganische Verbindungen wie Natrium-Nitroprussid.

Lange Zeit war der Wirkmechanismus der Nitrovasodilatoren nicht bekannt.

Schultz et al. (1977) konnten nachweisen, dass Natrium-Nitroprussid in glatten Muskelzellen zu einem Anstieg von cGMP führt, was auf eine Beteiligung der löslichen Guanylatzyklase (sGC) schließen ließ.

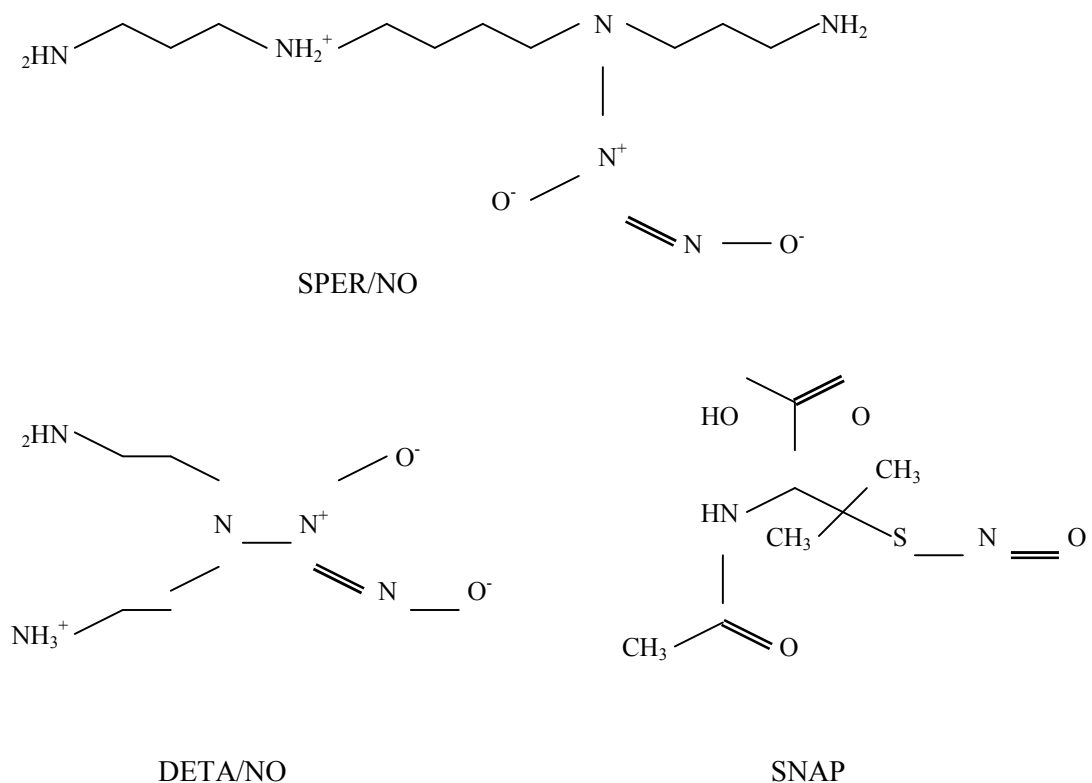
Die Arbeitsgruppe von Ignarro et al. (1981) konnte eine Beziehung zwischen der biologischen Wirkung von NO und dem freigesetzten NO aus organischen Nitraten zeigen. Zum damaligen Zeitpunkt wurde angenommen, dass es intrazellulär zur Bildung von Nitrosothiolen kommt, die erst dann die sGC aktivieren.

Die darauf folgenden Studien zeigten, dass nur solche Thiolverbindungen die sGC aktivieren, die wegen ihrer chemischen Instabilität direkt NO freisetzen (Schröder & Noack, 1986). In späteren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die organischen Nitrate erst bioaktiviert werden müssen, bevor sie NO freisetzen. Nach heutigen Erkenntnissen wird davon ausgegangen, dass organische Nitrate so genannte „prodrugs“ sind, die erst im Gewebe durch enzymatische Abspaltung von Nitratgruppen bioaktiviert werden (Chung & Fung, 1990).

Feelisch und Noack (1987) konnten zeigen, dass die gemeinsame biologisch aktive Substanz der organischen Nitrate NO darstellt. Weitere Ergebnisse erbrachten die Studien von Schröder et al. (1985) und Noack (1984), die nachweisen konnten, dass die

Anzahl der Nitratgruppen innerhalb eines organischen Nitrates mit der Wirkstärke der jeweiligen Verbindung korreliert. Nitrovasodilatoren sind keineswegs einheitliche Pharmaka. Sie lassen sich in organische Nitratester (z.B. GTN) und in spontan NO freisetzende Substanzen (wie SPER/NO, DETA/NO, SNAP) unterteilen (Noack & Feelisch, 1991). Die beiden spontanen NO-Donatoren SPER/NO und DETA/NO besitzen die Struktur  $X[N(O)NO]^+$ , wobei X den nukleophilen Teil darstellt. Maragos et al. (1991) haben gezeigt, dass diese Nukleophile bei einem physiologischen pH-Wert  $NO\bullet$  spontan freisetzen. In physiologischer Umgebung (pH 7,4 und 37 °C) dissoziieren diese beiden Substanzen im wässrigen Puffer. Für die NO-Bildung wurde für SPER/NO eine Halbwertszeit von ca. 39 Minuten, für DETA/NO von bis zu 15 Stunden beobachtet (Morley et al., 1993).

In der vorliegenden Arbeit wurden die spontanen NO-Donatoren SPER/NO (Inkubation von Rattenaorten), DETA/NO (Inkubation von HEK 293 Zellen) und SNAP (Bestimmung der Aktivität in Rattenaorten) verwendet (**Abb. 3**).



**Abb. 3** Chemische Strukturformeln von drei spontanen NO-Donatoren, die ausschließlich experimentelle Bedeutung haben.



### **1.3 Das endogene Stickstoffmonoxid (NO), seine physiologischen und pathophysiologischen Eigenschaften**

Im **kardiovaskulären System** werden NO mehrere **vasoprotektive** Wirkungen zugeschrieben. NO ist einer der wichtigsten Blutdruckregulatoren. Es wird in den Endothelzellen von der eNOS gebildet, diffundiert in die glatten Muskelzellen und bewirkt dort eine Vasodilatation über die Aktivierung der sGC.

Auch in Thrombozyten wird NO von der eNOS produziert. Über einen cGMP-abhängigen Mechanismus verhindert NO die Thrombozytenaggregation an der Gefäßwand. Durch Aktivierung der Proteinkinase G I (PKG I) wird Phospholamban phosphoryliert und die sarkoplasmatische-Retikulum-ATPasen (SERCA) aktiviert, was eine Sequestration von Kalzium bewirkt (Nguyen et al., 1991).

Einen zusätzlichen Mechanismus konnten Bowen & Haslam (1991) nachweisen: die indirekte Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase durch cGMP. cAMP wirkt mit cGMP synergistisch und senkt ebenfalls durch  $Ca^{2+}$ -Aufnahme die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration. Auf diesem Weg ist NO am Hämostasegleichgewicht beteiligt und trägt so zur Verhinderung von Thrombosen bei.

Außerdem hemmt NO die Adhäsion von Leukozyten an das Gefäßendothel (Kubes et al., 1991) und verlangsamt so die Entstehung von Gefäßschäden wie die Atherosklerose. Ross (1999) konnte feststellen, dass eine verstärkte Anlagerung von Leukozyten an Gefäßwänden eine wichtige Rolle zur Entstehung der Atherosklerose beiträgt.

Eine weitere Eigenschaft von NO ist die Fähigkeit die Proliferation glatter Muskelzellen zu hemmen. Sowohl endotheliales NO als auch exogen zugeführtes NO, wie in Inkubationsversuchen mit NO-Synthase-unabhängigen NO-Donatoren (wie z.B. SNAP und Natrium-Nitroprussid) gezeigt werden konnte, führen zu einer signifikanten Verringerung der Muskelzellproliferation (Nakaki et al., 1990; Scott-Burden et al., 1993). NO werden ebenfalls antioxidative Effekte zugeschrieben (Balla et al., 1992).

Im **Nervensystem** wird NO überwiegend von der nNOS gebildet. NO fungiert als „unspezifischer“ Neurotransmitter und ist in der neuronalen Erregungsübertragung im ZNS und im PNS beteiligt. Im ZNS spielt NO eine wichtige Rolle als Mediator der „Gedächtnisfunktionen“ (memory functions) (O'Dell, 91) und als Modulator der Schmerzwahrnehmung (Haley, 92). Im PNS reguliert NO die Funktion bzw. den Tonus

von Organen, die überwiegend aus glatten Muskelzellen bestehen (z.B. Urogenital- und Gastrointestinaltrakt). Neben seinen regulatorischen Effekten hat NO auch eine zytotoxische Wirkung auf neuronale Zellen, die zur Zerstörung der Nervenzellen führt. So konnte Nathan (1992) übermäßige Produktionen von NO bei neurologischen Krankheiten wie z.B. Morbus Parkinson oder Morbus Alzheimer feststellen.

Im **Immunsystem** wirkt NO in der unspezifischen Abwehr gegen pathogene Erreger wie z.B. Bakterien, Viren, Pilze oder Tumorzellen. NO wird hauptsächlich durch die Induktion der iNOS in neutrophilen Granulozyten und Makrophagen gebildet. Die hohen NO-Konzentrationen wirken toxisch und antiproliferativ auf pathogene Erreger. Bei einer Fehlregulation der iNOS kann es zu Krankheiten kommen, insbesondere Autoimmunerkrankungen (chronische Leber- und Nierenentzündungen, Gelenkrheumatismus und insulinpflichtiger Diabetes mellitus).

#### **1.4 Der NO•-cGMP-Signaltransduktionsweg**

NO• ist ein extrem kurzlebiges, freies körpereignes Radikal, das als endogener Botenstoff auf verschiedene Weise protektiv wirkt. Die wohl bekannteste Wirkung ist die Blutdruckregulation durch Vasodilatation (Nathan & Xie, 1994b). Dem NO werden aber auch antiaggregatorische, antiadhäsive, antiproliferative und antioxidative Effekte zugeschrieben, die durch eine Aktivierung der sGC in den betroffenen Zellen ausgelöst werden. Eine Ausnahme stellt die zytotoxische Wirkung von NO in der Immunabwehr dar.

Die Aktivierung der sGC katalysiert die Umsetzung von Guanosin triphosphat (GTP) zu zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP). Der Anstieg von cGMP führt zur Aktivierung von 2 cGMP-abhängigen Proteinkinasen G (PKG I und PKG II) (Murad, 1996). PKG I ist vor allem für die Vasodilatation und die Thrombozytenaggregation verantwortlich (Pfeifer et al., 1998). Die PKGs phosphorylieren dann verschiedene Proteine in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums (**Abb. 4**).

Die Phosphorylierung von Phospholamban ist ein Mechanismus des NO•-cGMP-Signaltransduktionsweges. Dies bewirkt eine Aktivierung der SERCA und führt zu einer raschen Aufnahme von intrazellulärem Kalzium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) in die Speicher des sarkoplasmatischen Retikulums.

Zusätzlich wird der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über spannungsabhängige L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle gehemmt (Robertson et al., 1993). So kommt es zur Erniedrigung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ .

Ein weiterer Mechanismus des  $\text{NO}\cdot$ -cGMP-Signaltransduktionsweges ist die Phosphorylierung eines neu entdeckten Proteins, IRAG (IP<sub>3</sub> Rezeptor assoziiertes cGMP-Kinase Substrat). Phosphoryliertes IRAG führt zur Hemmung der Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>)-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum und fördert die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in die intrazellulären Speicher. Dies bewirkt ebenfalls eine Erniedrigung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (Lincoln et al., 1995).

$\text{NO}$  kann weiterhin  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Kalium ( $\text{K}^+$ )-Kanäle aktivieren und so eine Erhöhung des  $\text{K}^+$ -Ausstromes aus der Zelle bewirken. Die dadurch resultierende Hyperpolarisation der Zellmembran verringert bzw. beeinträchtigt die depolarisierenden Signale und führt somit zur Verringerung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms. Dieser Effekt von  $\text{NO}$  verläuft sowohl cGMP-unabhängig d.h. durch direkte Aktivierung der  $\text{K}^+$ -Kanäle (Bolotina et al., 1994), als auch über die Aktivierung der PKG I (Sausbier et al., 2000).

Diese drei Mechanismen führen zusammen zu einer raschen Abnahme der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Dadurch kommt es zur einer geringeren Bildung von  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-Myosin-Komplexen, was zu einer Reduzierung von phosphoryliertem Serin<sub>19</sub> im regulatorischen Bereich der leichten Myosinkette führt und so eine Vasodilatation in den glatten Muskelzellen induziert (Horowitz et al., 1996).

Die Wirkung von cGMP wird durch seine schnelle Umsetzung zu GMP beendet. Diese Reaktion wird durch verschiedene Phosphodiesterasen (PDE) katalysiert, von denen vor allem PDE V spezifisch für cGMP ist (Soderling & Beavo, 2000).

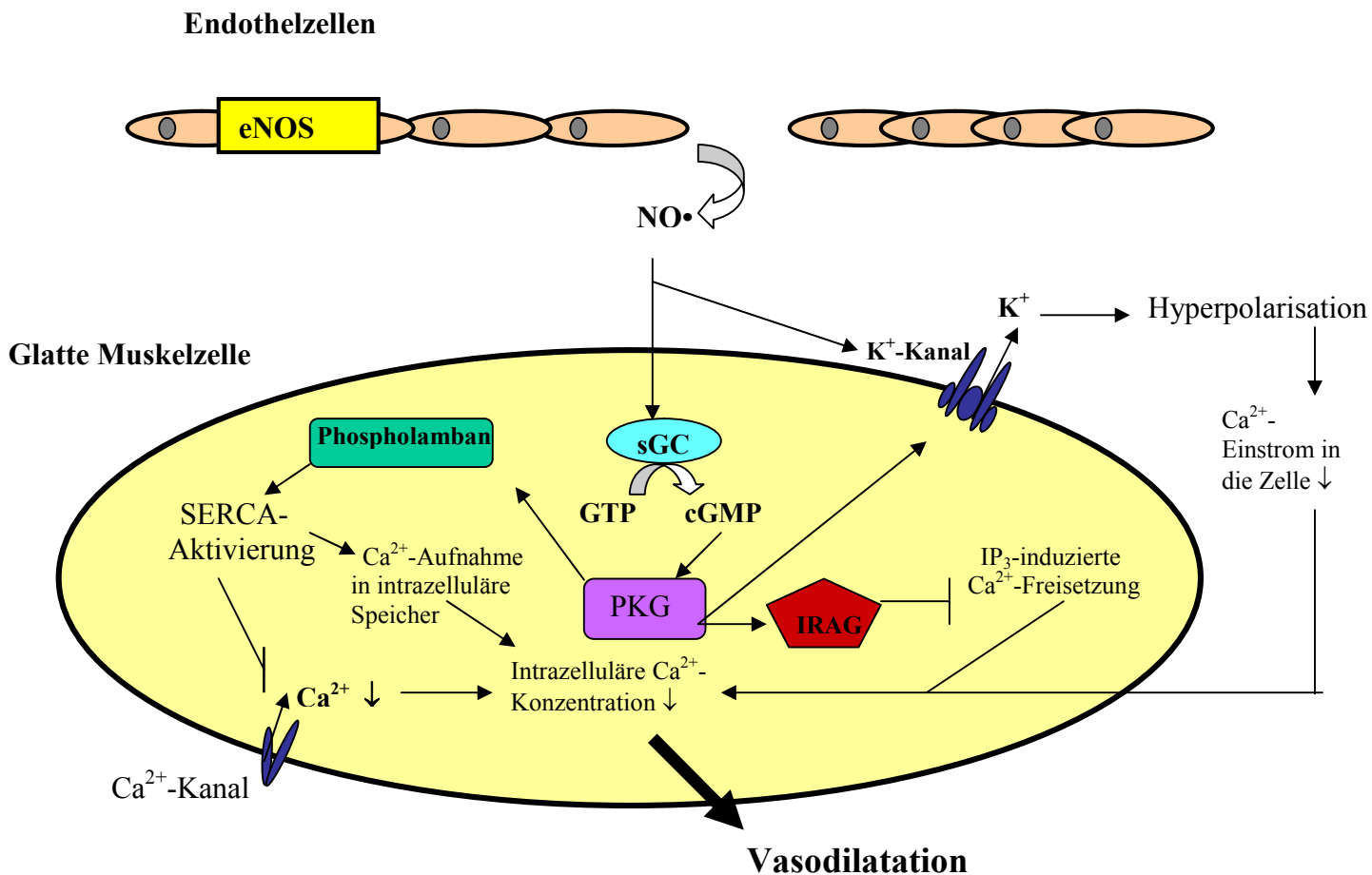


Abb. 4 Schematische Darstellung des NO•-cGMP-Signaltransduktionsweg: NO-induzierte Vasodilatation

### 1.5 Die lösliche Guanylatzyklase (sGC)

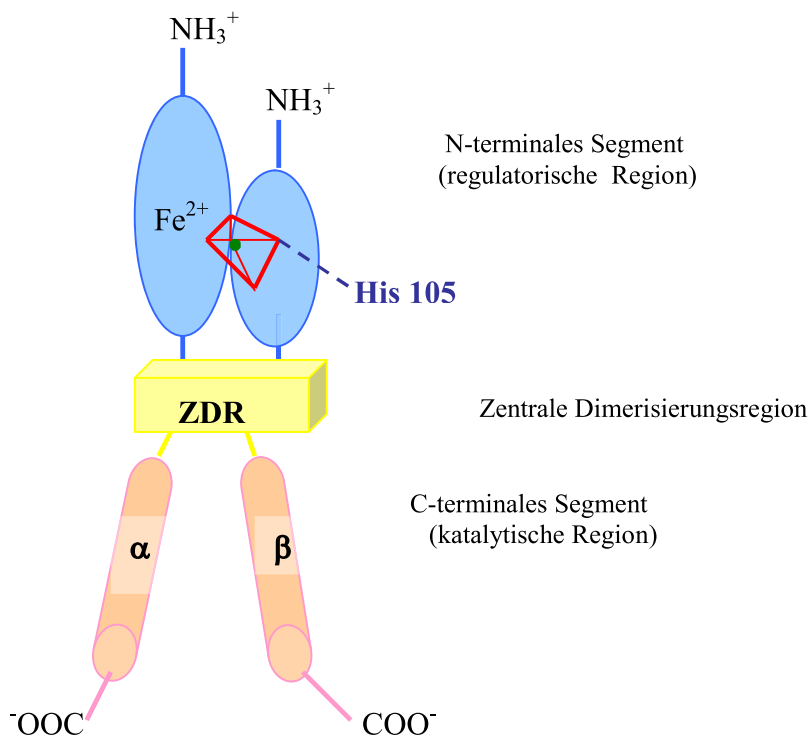
Die Guanylatzyklasen katalysieren die Umsetzung von cGMP zu GTP, welches als intrazellulärer „second messenger“ eine wichtige Rolle bei der Regulation verschiedener Funktionen in Zellen spielt. Guanylatzyklasen können in fast allen Geweben nachgewiesen werden, u. a. in glatten Muskelzellen, in Thrombozyten, sowie in Monozyten. Man kann sie in 2 Gruppen aufteilen: in eine **membrangebundene** und in eine **lösliche** Form. Die membrangebundene, so genannte „partikuläre“ Guanylatzyklase ist ein Monomer, das durch verschiedene Peptide stimulierbar ist (Friebe & Koesling, 1998) und zur Gruppe der Rezeptor-gekoppelten Enzyme mit einer membranüberspannenden Einheit gehört (Garbers et al., 1994).

Die im Zytosol gelöste Form, die so genannte „lösliche Guanylatzyklase“ (sGC), die in dieser Studie untersucht wurde, ist ein Heterodimer mit einer  $\alpha$ - Untereinheit und einer

$\beta$ -Untereinheit, die die Hämgruppe bindet (Buechler et al., 1991). Sie fungiert als Rezeptor für NO. Getrennt exprimierte Untereinheiten besitzen selbst keine katalytische Aktivität (Zabel et al., 1999), obwohl die Sequenzanalyse zeigt, dass jede Untereinheit eine regulatorische Region besitzt. Es sind insgesamt 4 Isoformen der sGC-Untereinheiten bekannt ( $\alpha_1, \alpha_2, \beta_1, \beta_2$ ) (Koesling et al., 1991).

Für den Menschen wurden 2 zusätzliche Untereinheiten ( $\alpha_3, \beta_3$ ) aus menschlichem Gehirn postuliert, die zunächst aufgrund von Sequenzfehlern für nicht identisch mit  $\alpha_1$  und  $\beta_1$  gehalten wurden (Koesling & Friebe, 1999). Die größte Bedeutung kommen der  $\beta_1$ -Untereinheit mit einem Molekulargewicht von ca. 70 kDa und der  $\alpha_1$ -Untereinheit mit einem Molekulargewicht von 73 kDa (Schwein, Rind) und 82 kDa (Mensch, Ratte) zu. Die regulatorischen Eigenschaften der sGC und die Bindung an die Hämgruppe werden hauptsächlich von der  $\beta$ -Untereinheit bestimmt. Die  $\alpha_1$ -/ $\beta_1$ -Untereinheiten werden hauptsächlich in Gefäßen exprimiert. Die  $\beta_2$ -Untereinheit wird vor allem in Niere, Leber und Herz exprimiert (Yuen et al., 1990), während die  $\alpha_2$ -Untereinheit im menschlichen fetalen Gehirn vorkommt (Harteneck et al., 1991).

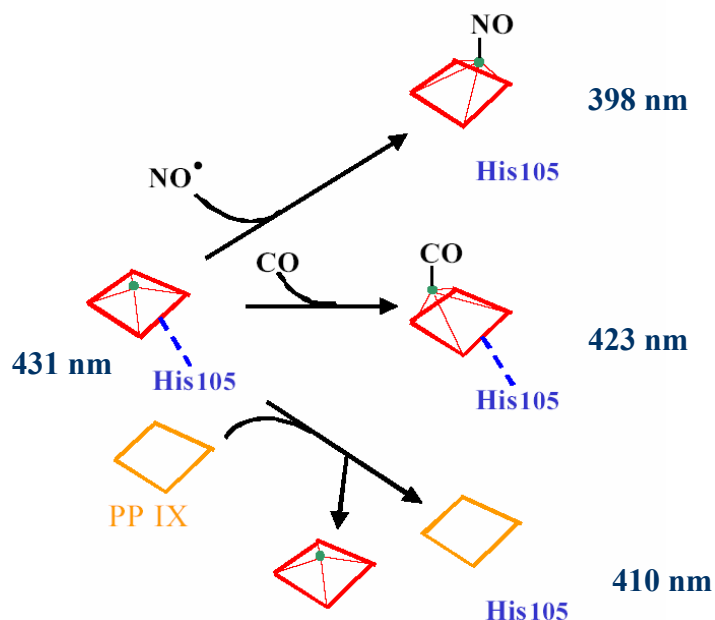
Beide Untereinheiten der sGC haben eine ähnliche Struktur: sie enthalten eine C-terminale katalytische Region, eine N-terminale regulatorische Region und eine zentrale Dimerisierungsregion (Schulz et al., 1991) (**Abb. 5**).



**Abb. 5** Schematische Darstellung der sGC

Für eine vollständige Aktivität der sGC muss sowohl die  $\alpha$ - als auch die  $\beta$ -Untereinheit exprimiert werden. Eine notwendige Voraussetzung für die katalytische Synthese von cGMP aus GTP ist wie bei allen Nukleotidzyklasen die Komplexierung der Nukleotidtriphosphate mit zweiwertigen Ionen. Für die sGC spielt biologisch das Metallion  $Mg^{2+}$ , experimentell auch  $Mn^{2+}$  eine wichtige Rolle. Die Metallione sind für die Bindung der Substrate an die C-terminale Region unerlässlich (Wolin et al., 1982). Die sGC ist ein Hämprotein, welches ein Häm-Molekül pro Heterodimer besitzt (Humbert et al. 1990). Die Hämgruppe der sGC befindet sich an der N-terminalen Region der  $\beta_1$ -Untereinheit und ist an Histidin-105 gebunden (Wedel et al., 1994). Im nicht-aktiven Zustand zeigt die sGC ein Absorptionsmaximum bei 431 nm (Gerzer et al. 1981). Bei der Aktivierung der sGC durch NO, bindet NO direkt an die sechste Position des Eisenatoms der Hämgruppe, es kommt zur Bildung eines sechsfach-koordinierten Häm-Nitrosyl-Komplex; indem die im basalen Zustand vorhandene Histidin-105 Bindung aufgebrochen wird (**Abb. 6**).

Koesling (1998) konnte zeigen, dass es dabei zu einer Konformationsänderung und zu einer Verschiebung des Absorptionsspektrums kommt; es entsteht ein fünffach-koordinierter Häm-Nitrosyl-Komplex mit einem Absorptionsmaximum von 398 nm.



**Abb.6** Schema der Aktivierung der Guanylatzyklase durch NO•, CO und Protoporphyrin IX.

NO• und CO heben das zentrale Fe des Häms aus der planaren Ebene zu einer tetrahedrale Konfiguration heraus. Protoporphyrin IX wirkt durch Verdrängung des Häms (übernommen aus Koesling 1999).

Durch NO kann die Aktivität der sGC bis zu 400-fach erhöht werden (Humbert et al., 1990; Stone & Marletta, 1995).

Die sGC kann auch durch Kohlenmonoxid (CO) aktiviert werden. Hierbei wird wie bei NO ein Komplex mit dem Eisenatom des Häms gebildet, es entsteht ein sechsfach-koordinierter Häm-Carbonyl-Komplex mit Absorptionsspektrum bei 423 nm, die Histidin-105 Bindung bleibt jedoch intakt (**Abb. 6**). Die Stimulierung der sGC durch CO ist aber wesentlich niedriger, nur zirka vier- bis sechsfach, da der gebildete Eisen-Häm-Komplex sehr instabil ist (Brüne et al., 1990). Die eisenfreie Vorstufe des Häms, das Protoporphyrin IX ist in der Lage NO-unabhängig die sGC zu aktivieren. Dabei kommt es zur strukturellen Veränderungen der sGC indem es den Häm-Nitrosyl-Komplex nachahmt mit einem Absorptionsspektrum bei 410 nm (Ignarro, 1994). Im Gegensatz zu NO oder CO stimuliert Protoporphyrin IX die häm-freie sGC.

Friebe et al. (1996) konnten zeigen, dass die sGC über 3'-(5'-Hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzylindazol (YC-1) NO-unabhängig aktiviert wird. YC-1 wurde bereits von Wu et al. (1995) als NO-unabhängiger Aktivator der sGC in Thrombozyten beschrieben.

Der Mechanismus der Aktivierung der sGC durch YC-1 ist noch nicht vollständig geklärt. Die Aktivierung der sGC durch YC-1 ist unabhängig von NO, die prosthetische Gruppe ist jedoch, obwohl keine direkte Verbindung mit YC-1 besteht, erforderlich. Die Substanz YC-1 erhöht die Empfindlichkeit der sGC gegenüber NO oder CO (Friebe & Koesling, 1998). Eine Stimulation der sGC mit NO führt in Gegenwart von YC-1 zu einer weitaus höheren Aktivierung als durch NO oder YC-1 alleine (Mülsch et al., 1997). Dies weist darauf hin dass NO und YC-1 synergistische Effekte aufweisen.

Die Funktionalität und Expression der sGC kann über verschiedene Mechanismen reguliert werden. NO• kann selbst durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus die sGC-Expression durch Verringerung der mRNA-Bildung der  $\alpha_1$ - und  $\beta_1$ -Untereinheiten regulieren. NO gilt als physiologischer Regulator der sGC.

## 1.6 Fragestellung

Das zentrale Enzym des NO•-cGMP-Signalweges ist die sGC.

In Anbetracht der großen Bedeutung der sGC bei der Vermittlung des NO-Signals in eine zelluläre Antwort wurde in dieser Arbeit die Regulation der sGC durch NO untersucht. Es stellte sich die Frage inwieweit die sGC durch NO über einen Rückkopplungsmechanismus reguliert wird.

- Gibt es Hinweise für einen Rückkopplungsmechanismus der sGC durch NO *in vitro*?

Um herauszufinden, ob eine erhöhte NO-Bioverfügbarkeit mit Veränderungen der sGC-Expression und -Aktivität einhergeht, wurden Untersuchungen an humanen embryonalen Nierenzellen (Bestimmung der mRNA-sGC-Expression) und an glatten Muskelzellen von Rattenaortensegmenten (Bestimmung der Proteinexpression und der Aktivität der sGC) durchgeführt.

Falls in dieser *in vitro* -Studien eine Regulation der sGC über Veränderungen der NO-Konzentration gezeigt werden kann, stellt sich eine weitere Frage inwieweit dieser Mechanismus *in vivo* eine Rolle spielt.

- Existiert dieser Rückkopplungsmechanismus auch *in vivo*?



## 2. Material und Methode

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Substanzen und Chemikalien

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
Agar	Merck, Darmstadt
Aluminiumoxid 90	Merck, Darmstadt
Ampicillin	PAA Laboratories, Cölbe
BSA	New England Biolabs, Frankfurt
CaCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
cGMP	Fluka, Buchs
Coomassie Brilliant Blue G	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DETA	Alexis Biochemicals, Grünberg
DMEM	PAA Laboratories, Cölbe
DMSO	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DNA Leiter (100 bp)	Invitrogen™, Karlsruhe
DNA-SuperFect®-Reagenz	Qiagen, Hilden
DTT	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ethanol	Merck, Darmstadt
FBS	PAA Laboratories, Cölbe
Glucose	Merck, Darmstadt
GTP	Fluka, Buchs
G418-Sulfat-Lösung	Calbiochem®, Darmstadt
Hepes	Merck, Darmstadt
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
IBMX	Fluka, Buchs
Isopropanol	Merck, Darmstadt
KCl	Merck, Darmstadt
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
Lumi-Light Western Blotting Substrate	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
MgSO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
NaHCO <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt
NaOH	Merck, Darmstadt
PBS	PAA Laboratories, Cölbe

pcDNA3-Vektor	Invitrogen™, Karlsruhe
PCR-Mastermix Eppendorf®	Eppendorf, Hamburg
Penicillin G	PAA Laboratories, Cölbe
Plasmid Mini, Midi, Maxi Kit®	Qiagen, Hilden
PMSF	Fluka, Buchs
Proteaseinhibitoren-Mix	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
QIAquick Gel Extraction Kit®	Qiagen, Hilden
RevertAid™H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
RNA Transcription Kit“	Stratagene, Amsterdam
Streptomycin	PAA Laboratories, Cölbe
SuperFect®-Reagenz	Invitrogen™, Karlsruhe
TOPO TA Cloning® Kit	Invitrogen™, Karlsruhe
TRI Reagenz ®	Invitrogen™, Karlsruhe
Trypsin/ EDTA	PAA Laboratories, Cölbe

### 2.1.2 Lösungen und Puffer

**Nährmedium für die Zellkultur:** DMEM mit L-Glutamin und 4,5 mg/l D-Glucose, FBS (10 %), Penicillin G (100 U/ml) und Streptomycin (0,1 mg/ml)

**10x MOPS-Puffer:** EDTA, 10 mM; MOPS, 20 mM; Na-Acetat, 50 mM; pH auf 7,0 einstellen

**Denaturierungslösung:** 100 µl Formamid, 35 µl Formaldehyd (37 %), 20 µl von 10x MOPS, 2 µl Ethidiumbromid

**Blaumarker für Agarose-Gel :** 30 % Glycerol; 0,25 % Bromphenol Blau

**P1-Resuspensions-Puffer:** Tris HCl, 50 mM; EDTA, 10 mM; 100 µg/ml RNase A; pH auf 8,0 einstellen

**P2-Lysispuffer** NaOH, 200 mM; 1 % SDS

**P3-Neutralisations-Puffer:** Kac-Lösung, 3 M; pH auf 5,5 einstellen

**LB-Medium:** 1,0 % Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 0,5 % NaCl

**TE-Puffer:** Tris HCl, 10 mM; EDTA, 1mM; pH auf 8,0 einstellen

**50 x TAE-Puffer:** Tris, 2 M; 5,71 % Essigsäure, EDTA, 50 mM; pH auf 7,8 einstellen

**Zell/Gewebe-Lysispuffer:** Tris, 5 mM (pH 7,6); DTT, 5 mM; PMSF, 100 mM in DMSO 0,2 mM; Proteaseinhibitoren-Mix: Antipain, Aprotinin, Benzamidin, Leupeptin (10 µg/ml)

**Krebs-Hepes Puffer:** NaCl, 99 mM; KCl, 4,69 mM; CaCl<sub>2</sub>, 1,87 mM; MgSO<sub>4</sub>, 1,20 mM; NaHCO<sub>3</sub>, 25 mM; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,03 mM; Na-Hepes, 20 mM; D-Glucose, 11,10 mM; pH auf 7,4 einstellen

**Cocktail-Puffer pH 7,4:** Na-Hepes, 10 mM; CaCl<sub>2</sub>, 10mM

**Stop-Puffer pH 5,5 :** Na-Hepes, 20mM ;EDTA, 2mM; EGTA, 2mM

**4x Trenngelpuffer pH 8,8:** Tris/HCl, 1,5 mM; SDS 0,4%

**Sammelgelpuffer pH 6,8:** Tris/HCl, 0,25 mM; SDS 0,2%

**Probenpuffer:** Tris, 50 mM; SDS 2%; Glycerol 10%; Bromphenolblau 0,0005%

**Western Blot Puffer pH 8,5:** Tris, 25 mM; Glycin, 200 mM; Methanol 20%

**10x Tank-Puffer pH 8,6:** Tris, 250 mM; Glycin, 1,9 mM; SDS 0,1%

**TBST(Tris-buffer-saline-tween)-Puffer pH 7,6:** Tris, 20mM; NaCl, 0,15 mM; Tween 20, 0,1%

**Herstellung des Sammelgels 4,5%:** Acrylamid/Bisacrylamid-Fertiglösung 30% 2,4 ml; 4x Sammelgel 4 ml; Aqua dest. 9,3 ml; APS (Ammoniumpersulfat 10%) 150 µl; TEMED 10 µl

**Herstellung des Trenngels :** Acrylamid/Bisacrylamid-Fertiglösung 30% 4,7 ml; 4x Trenngel 4,7 ml; Aqua dest. 9,3 ml; APS (Ammoniumpersulfat 10%) 150 µl; TEMED 10 µl

### 2.1.3 Geräte

Geräte	Hersteller
Blotting Apparatur	Biorad, München
Counter	Beckmann Instruments, USA
Elektrophoresekammer	Biorad, München
Eppendorf BioPhotometer®	Eppendorf Hamburg
Mastercycler gradient	Eppendorf Hamburg
Photometer	Beckmann, Model 25 Spektrophotometer DU® 640, USA
Polytron®	Kinematica GmbH, Luzern
Ultraschallbad	Sonorex, Berlin
Ultra Turrax T8	Ika Labortechnik Staufen
UVette®-Küvetten	Eppendorf, Hamburg

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Zellkultur**

„Human embryonal kidney cells“, Humane embryonale Nierenzellen (HEK 293 Zellen) waren ein Geschenk der Arbeitsgruppe K. K. Griendling Emory University Atlanta, GA, USA und von der Arbeitsgruppe Prof. K. Schrör Institut für Pharmakologie und klinische Pharmakologie, Universität Düsseldorf.

### **2.2.2 Allgemeine Bedingungen für die Zellkultur**

#### **Kultivierung der Zellen**

Die Passagierung auf neue Well-Platten erfolgte, je nach Konfluenz der Zellen, in den Falconflaschen. Die konfluenten Zellen wurden zunächst einmal mit PBS gewaschen und anschließend mittels 0,25 % Trypsin/EDTA abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden in Nährmedium aufgenommen und in ein 50 ml Falconröhrchen überführt. Die Zellen wurden für 5 min bei 800 rpm zentrifugiert, das Zellpellet anschließend in frischem Nährmedium resuspendiert.

Die HEK 293 Zellen, die transfizierten HEK 293 Zellen und die mit DETA/NO inkubierten HEK 293 Zellen wurden für die Versuche in 6-Well-Platten mit einer Konzentration von ca.  $10^5$  Zellen/Well ausgesät. Die Zellzahl wurde im Nährmedium mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die HEK 293 Zellen wurden in 6-Well-Platten im Inkubator bei 37°C in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre, die 5% CO<sub>2</sub> enthielt, kultiviert. Das Nährmedium wurde jeden zweiten bis dritten Tag erneuert. Alle Versuche wurden bei Konfluenz der Zellen durchgeführt.

#### **Einfrieren der Zellen**

HEK 293 Zellen wurden im konfluenten Zustand einmal mit PBS gewaschen und wie gewohnt trypsinisiert. Nach dem Zentrifugieren (5 min, 800 rpm) wurde das Zellpellet in Einfriermedium (7% DMEM, 2% FBS, 1% DMSO) aufgenommen und in Cryonröhrchen überführt. Das DMSO verhinderte die Kristallbildung innerhalb der Zellen. Das Einfrieren sollte jedoch dabei langsam erfolgen, um Schäden durch Kristallisationsprozesse zu vermeiden. Deshalb wurden die Gefriereröhrchen zunächst in einer Gefrier-Isobox für 2-3 Tage bei -80°C gelagert bevor sie im flüssigen Stickstoff aufbewahrt wurden.

## 2.2.3 Klonierung des WT-Vektors bzw. des leeren Vektors

### 2.2.3.1 Transformation und Kultivierung von *E. coli*

Für die Vermehrung bzw. Klonierung von Plasmid-DNA wurden *E. coli* Stämme mit folgendem Genotyp verwendet:

TOP 10                      F<sup>'</sup>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)Φ80lacX74recA1 deoR  
araD139Δ(araleu)7697 galK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nupG

Invitrogen™, Karlsruhe

Für die Herstellung von festem Nährboden, der auf Platten gegossen wurde, wurde dem Luria Bertani-Medium (LB) 1,2 % Agar zugegeben. Zur Selektion der Bakterien, die ein Plasmid mit Antibiotikaresistenz enthielten, wurde dem LB-Medium 100 µg/ml Ampicillin zugesetzt. Die Bakterienstämme wurden bei 37°C angezüchtet. Die Platten wurden bei 4 °C höchstens 2 Monate lang gelagert.

Die Transformation mit *E. coli* wurde nach der Methode von Hanahan (1983) durchgeführt.

Die transformationskompetenten *E. coli* wurden mit 1-10 ng Plasmid-DNA (pcDNA3-Vektor oder bovinem eNOS-Plasmid im pcDNA3-Vektor) gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 30 s bei 42 °C einem Hitzeschock unterzogen und danach sofort für 1-2 min auf Eis abgekühlt. Den Zellen wurde danach 1 ml LB-Medium (ohne Ampicillin) zugegeben und zum besseren Wachstum für 1h bei 37°C geschüttelt. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen bei 6.000 x g für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 100 µl LB aufgenommen und auf antibiotikahaltigen LB-Agar-Platten (50-100µl) ausplattiert. Die Bakterien wurden über Nacht bei 37°C im Inkubator gezüchtet.

Für die Herstellung der Startkultur wurden 3 ml LB-Medium (mit Ampicillin) mit einer Einzelkolonie angeimpft und vorkultiviert. 1,5 ml dieser Startkultur wurde für mindestens 8 h oder über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert und für die anschließende Miniplasmid-Isolierung angezogen. Der Rest der Startkultur wurde zur Herstellung der Hauptkultur bei -80 °C eingefroren. Für die Herstellung der Hauptkultur wurden die jeweiligen Startkulturen zu 25 -100 ml LB-Vollmedium (mit

Ampicillin: 100 µg/ml) zugegeben, über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert und für die anschließende Midi- oder Maxi-Plasmid-Isolierung angezogen.

### **2.2.3.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli-Zellen**

#### **DNA-Plasmid-Mini-Präparation**

Die Miniplasmid-Präparation wurde nach dem Prinzip der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (1979) durchgeführt.

1,5 ml der Startkultur der angeimpften Bakterien wurden durch Zentrifugation (5 min bei 6.000 x g) geerntet und das Zellpellet in 250 µl P1-Resuspensionspuffer aufgenommen. Nach Zugabe von 250 µl P2-Lysispuffer wurde der Ansatz für 3 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Durch Zugabe von 250 µl P3-Neutralisationspuffer wurden Zellbestandteile und Proteine ausgefällt. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis, wurden die ausgefällten Zellbestandteile für 10 min bei 10.000 x g und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand, der die DNA enthielt, wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 2,5 Volumenteilen (800 µl) eiskaltem 96% Ethanol gefällt. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 10.000 x g und 4 °C, wurde der Überstand verworfen und das DNA-Pellet in 50 µl TE-Puffer gelöst. Zum Teil erfolgte die DNA-Plasmid-Mini-Präparation auch mit dem Qiagen Plasmid Mini Kit®, dann wurde anhand des Protokolls der Firma gearbeitet.

#### **DNA-Präparationen in größerem Ansatz**

Die Plasmid-DNA, die in größeren Mengen benötigt wurde, wurde mit dem Qiagen Plasmid Midi® Kit (bis zu 100 µg Plasmid-DNA) oder Qiagen Plasmid Maxi® Kit (bis zu 500 µg Plasmid-DNA) isoliert und gereinigt. Die Präparationen wurden nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Das Prinzip entspricht dem der Mini-Plasmid-Präparation, wobei jedoch 25-100 ml Bakterienkulturen (Hauptkulturen) angezüchtet wurden. Die über Nacht wachsende Kultur wurde in 50 ml Falconröhrchen überführt und durch Zentrifugation (6.000 x g, 15 min, bei 4 °C) geerntet. Resuspension, Lyse und Neutralisation erfolgten in entsprechend größeren Ansätzen. Die DNA wurde mit 0,7 Volumenteilen Isopropanol gefällt, 30 min bei 4 °C mit 15.000 x g zentrifugiert und das Pellet mit 70%-igem Ethanol einmal gewaschen. Nach anschließender Zentrifugation (15.000 x g, 15 min. bei 4 °C) wurde das Pellet an der Luft getrocknet. In 50-100 µl TE-

Puffer oder autoklaviertem H<sub>2</sub>O wurde die DNA resuspendiert und ihre Konzentration photometrisch bestimmt.

#### **DNA-Konzentrationsbestimmung**

Die Konzentration von DNA wurde mit dem Eppendorf BioPhotometer® UV-spektrophotometrisch bei den Wellenlängen 260 und 280 nm nach Herstellerangaben vermessen. Dabei wurden UVette®-Küvetten verwendet und eine DNA-Verdünnung in einem Endvolumen von 50 µl gemessen. Die Konzentration der DNA wurde aus folgendem Koeffizienten bestimmt:  $A_{260} = 50 \mu\text{g/ml}$  doppelsträngige DNA.

Die Menge der UV-Strahlung, die von einer DNA-Lösung absorbiert wird, ist ihrem DNA-Gehalt direkt proportional. Die Reinheit der DNA-Probe wurde durch das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) überprüft. Bei einer reinen DNA-Probe liegt dieser Wert zwischen 1,7 und 2,0.

#### **2.2.3.3 DNA-Restriktion, und DNA-Auftrennung**

Die isolierten Plasmide wurden durch Restriktionsverdau überprüft.

Für das sequenzspezifische Schneiden der Plasmid-DNA wurden Restriktionsendonukleasen (Firma New England Biolabs, NEB, Frankfurt) verwendet. Eine Unit (1 U) vom Enzym wurde für 1 µg Plasmid-DNA benötigt und für 1 Stunde bei entsprechender Temperatur inkubiert. Puffer und Reaktionstemperatur wurden nach Herstellerangaben gewählt.

Je nach der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente schwankte die Agarosekonzentration zwischen 1% und 2% (w/v). Die DNA-Fragmente wurden in den Agarose-Gelen aufgetrennt und analysiert. Als Laufpuffer diente 1 x TAE-Puffer. Zu den Proben wurden 5 µl Blaumarker hinzugefügt und in die Geltaschen geladen. Um die Nukleinsäuren unter UV-Licht sichtbar zu machen, wurde der Gellösung unmittelbar vor dem Gelgießen 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Als DNA-Größenstandard wurde eine 100 bp DNA-Leiter verwendet. Die Bilder wurden mit dem Programm Gel Doc 1000® (Biorad, München) aufgenommen um die DNA-fragmentgröße zu bestimmen.

#### **2.2.3.4 DNA-Isolation und DNA-Reinigung**

Zur Isolation von DNA-Fragmenten wurde die gewünschte Bande mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die Reinigung erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit® nach Herstellerangaben.

#### **2.2.3.5 DNA-Linearisierung und DNA-Ligation**

Bevor man DNA-Fragmente in einen Vektor legiert, müssen diese linearisiert werden. Für die Linearisierung der Plasmid-DNA wurde die DNA mit alkalischer Phosphatase für 1 h bei 37°C behandelt. Die Ligation erfolgte mittels einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 1 Unit T4-DNA-Polymerase für 2-3 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16°C.

#### **2.2.4 Stabile Transfektion in HEK 293 Zellen**

Zur stabilen Transfektion von HEK 293 Zellen wurde SuperFect®-Reagenz benutzt. Dieses speziell gestaltete, aktivierte Dendrimer besitzt die Eigenschaft, DNA in eine kompakte Struktur zu betten, so dass sie optimal in die Zellen aufgenommen werden kann. Die SuperFect®-DNA Komplexe tragen eine positive Ladung und können an negativ geladenen Rezeptoren der Zelloberfläche binden. Über die Rezeptoren werden sie in das Innere der Zellen geschleust und lagern sich an Endosome. Die SuperFect®-DNA Komplexe führen zur pH-Inhibition lysosomaler Nukleasen und erhöhen so die Stabilität des Komplexes.

Zur Transfektion wurden pro Plasmid 40-80% konfluente HEK 293 Zellen auf einer 60 mm Petrischale ausgesät. 5 µg der Plasmid-DNA und 20 µl SuperFect® wurden zunächst in 150 µl serum- und antibiotikafreiem Nährmedium bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert. In dieser Studie wurde als Plasmid-DNA eine bovine eNOS im pcDNA3-Vektor (WT) und der pcDNA3-Vektor (Kontrolle) verwendet.

Das Plasmid mit der bovinen eNOS war ein Geschenk der Arbeitsgruppe von Dr. David Harrison, Atlanta, GA, USA. Der pcDNA3-Vektor war von der Firma Invitrogen™, Karlsruhe.



Die Zellen wurden in der Zwischenzeit einmal mit PBS gewaschen und mit 2 ml Nährmedium (DMEM) versetzt. Zu der DNA-SuperFect®-Mischung wurde 1 ml Nährmedium zugegeben, durch zweimaliges Pipettieren gemischt und dann auf die Zellen gegeben.

Nach 2-3-stündiger Inkubation bei 37°C wurde dreimal mit PBS gewaschen und frisches Nährmedium zugesetzt. Nach 24-48 h Inkubation und eventuellem Splitten wurde erst nach 1-2 Tagen selektives Medium zugesetzt. Zur Selektion transfizierter Zellen wurde dem Nährmedium Geneticin-Sulfat (G418-Sulfat-)Lösung in einer Konzentration von 800 µg/ml zugesetzt (= „selektive Medium“).

Der pcDNA3-Vektor trägt das Resistenzgen gegen G418-Sulfat. In Gegenwart dieses Antibiotikum sterben alle nicht transfizierten Zellen ab, d.h. die Zellen die nicht mit dem pcDNA3-Vektor (mit oder ohne bovine eNOS-DNA) infiziert waren. Die überlebenden transfizierten Zellen wurden isoliert, kultiviert und solange passagiert bis genug Zellen für fünf 150 mm Petrischalen pro Plasmid vorhanden waren.

Die transfizierten Zellen wurden auf ihre Proteinexpression getestet.

Nach 3 Wochen wurde die Dosierung des G418-Sulfat auf 400 µg/ml reduziert und nach 6 Wochen wurde das selektive Antibiotikum nicht mehr dem Nährmedium zugesetzt, da zu diesem Zeitpunkt die Zellen stabil transfiziert waren.

### **2.2.5 Inkubation der HEK 293 Zellen mit DETA/NO**

Für die Inkubation der HEK 293 Zellen mit DETA/NO, einem NO-Donator, wurden die Zellen 1-2 Tage zuvor auf eine 6 Well-Platte passagiert. 24 Stunden vor der Inkubation wurde das Nährmedium der HEK 293 Zellen abgesaugt und nur Hungermedium (DMEM + Penicillin G, Streptomycin ohne FBS) auf die Zellen zugegeben. Nach der 24-stündigen Inkubation wurde das Hungermedium abgesaugt und jeweils ein Well für 6 h bei 37°C (5% CO<sub>2</sub>) mit 100 µM DETA/NO inkubiert. Nach 6-stündiger Inkubation wurde die RNA von den Zellen präpariert (s. 2.2.7.1).

### 2.2.6 PCR (Polymerasekettenreaktion)

Die Polymerasekettenreaktion ist eine Methode zur selektiven Vervielfältigung (Amplifikation) eines beliebigen DNA-Abschnittes.

Zwei kurze einzelsträngige Oligonukleotide (Primer), die für die DNA-Synthesereaktion dienen, begrenzen den zu vervielfältigenden DNA-Abschnitt. Als Ausgangsmaterial dient Doppel- oder Einzelstrang-DNA. Die Reaktionen eines Zyklus, Denaturierung der DNA, Hybridisierung der Primer (annealing) und DNA-Polymerisation laufen bei unterschiedlichen Temperaturen ab.

Bei 93-100 °C trennen sich die beiden Einzelstränge der Ausgangs-DNA (*Denaturierung*). Nach Absenken der Temperatur auf 40-60°C binden die Primer an die Einzelstränge (*Annealing*) und bilden kurze Doppelstrang-Bereiche, deren freie 3'-Enden von der DNA-Polymerase erkannt werden. Anschließend wird die Temperatur auf 72 °C, das Temperatur-Optimum für die DNA-Polymerase, erhöht. Es kommt dann ausgehend von den 3'-Enden der Primer-Hybride zur Synthese des komplementären Stranges (*Elongation*). In jedem Zyklus entstehen aus der Ausgangs-DNA 2 neue, die je zur Hälfte *de novo* synthetisiert wurden. Durch vielfache Wiederholung (z.B. 35 Zyklen) wird das DNA-Fragment exponentiell vermehrt ( $2^{35}$ ).

Für die in dieser Studie durchgeführten PCR-Reaktionen wurde ein vorgefertigter PCR-Mastermix der Firma Eppendorf® eingesetzt zu dem nur noch die cDNA (Template aus der RT-Reaktion) oder Plasmid-DNA und die Primer hinzugegeben wurden und anschließend mit deionisiertem H<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 25 µl aufgefüllt wurden.

Der PCR-Mastermix beinhaltet Taq DNA Polymerase (62.5 U/ml), 2,5 x Taq Reaktionspuffer (mit 125 mM KCl, 75 mM Tris-HCl (pH 8,3), 3,75 mM Mg<sup>2+</sup>, 0,25% Nonidet®-P40), 500 µl dNTP, Stabilisatoren). Die verwendeten Primer wurden von der Firma Invitrogen™ (Karlsruhe) hergestellt. Die PCR-Reaktionen erfolgten im Mastercycler Gradient®.

#### Primer für PCR:

sGC 5' com-Primer: (20 bp) 5'-GAA GAC ATC AAA AAA GAG GC-3'

sGC 3' com-Primer: (19 bp) 5'-GAG AAG ACA GAC AGA AGG C-3'

Für einen Reaktionsansatz wurde folgendes Gemisch zusammenpipettiert:

3'-Primer (2 µM) :	5 µl
5'-Primer (2 µM) :	5 µl
PCR-Mastermix :	10 µl
H <sub>2</sub> O :	variabel
Template (DNA) :	variabel
<hr/>	
Gesamtvolumen :	25 µl

Das PCR-Programm wurde für das jeweilige Primer-Paar optimiert.

Entweder wurde die *Annealing*-Temperatur und/ oder die Zyklenzahl variiert.

Nach erfolgter Reaktion wurde die DNA im Agarosegel aufgetrennt.

Je nach der Größe der zu trennenden Nukleinsäuren-Fragmenten schwankte die Agarosekonzentration zwischen 1% und 2% (w/v). Als Laufpuffer diente 1 x TAE-Puffer. Um die Nukleinsäuren unter UV-Licht sichtbar zu machen, wurde der Gellösung unmittelbar vor dem Gelgießen Ethidiumbromid zugesetzt.

## **2.2.7 Präparation und Analyse von RNA aus HEK 293 Zellen in der RT-PCR**

### **2.2.7.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus HEK 293 Zellen**

Für die Analyse von RNA wurde mit RNase freien Plastikmaterialien, DEPC-behandeltem Wasser und Handschuhen gearbeitet. RNAsen sind sehr stabile und aktive Enzyme, die im Allgemeinen keine Kofaktoren für ihre Funktion brauchen, weswegen sie sehr schwer zu inaktivieren sind. Spuren von RNAsen reichen aus um RNA zu zerstören. RNAsen können mittels DEPC inaktiviert werden.

Zur Herstellung von DEPC-Wasser wurde deionisiertes Wasser angesetzt das mit 0,1% (v/v) DEPC behandelt und über Nacht inkubiert wurde. Im Anschluss daran wurde das Wasser autoklaviert um DEPC zu inaktivieren. DEPC zerfällt zu H<sub>2</sub>O und Ethanol.

Bei allen RNA-Analysen wurden Lösungen und Reaktionsansätze mit DEPC-Wasser versetzt. Die Isolierung der Gesamt-RNA aus den HEK 293 Zellen mittels TRI Reagenz® basiert auf der Methode nach Chomczynski & Sacchi (1987).

Zur Isolierung der RNA aus den HEK 293 Zellen wurde immer die gleiche Zellzahl benutzt. 1 ml TRI Reagenz wurde pro well auf Zellkultur getan, 10 min bei Raumtemperatur inkubieren lassen und anschließend in Eppendorfgefäße überführt.

Danach wurden 200 µl Chloroform zugesetzt, Proben etwa 15 s kräftig geschüttelt, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 20 min bei 12.000 x g und 4°C zentrifugiert. Bei der Zentrifugation kommt es zur Trennung der Probe in 3 Phasen. Die RNA, die sich in der oberen farblosen wässrigen Phase befindet, wird in ein neues Eppendorfgefäß umpipettiert und zur Fällung mit 500 µl Isopropanol versetzt. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur, wurde die präzipitierte RNA mindestens 15 min bei 4°C mit 12.000 x g abzentrifugiert. Nach der Zentrifugation war die RNA als Pellet sichtbar, der Isopropanolüberstand wurde vorsichtig abgeschüttet. Das RNA-Pellet wurde mit 1 ml Ethanol ( 75% in DEPC ) gewaschen, dann für 10 min bei 4°C bei 7500 x g zentrifugiert, an der Luft getrocknet für 10-15 min und anschließend in 50 µl DEPC- Wasser gelöst. Nach 10-minütiger Inkubation bei 55°C (verbesserte Lösbarkeit des RNA-Pellets) wurde das RNA-Pellet für mindestens 2 min auf Eis inkubiert. Abschließend folgten eine photometrische Konzentrationsbestimmung und die gelelektrophoretische Auftrennung von RNA.

#### **Bestimmung der RNA-Konzentration**

Die RNA-Konzentration wurde UV-spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm in einem Volumen von 50 µl mit dem Biophotometer® nach Herstellerangaben bestimmt. Dabei wurden UVette®-Küvetten verwendet. Der  $A_{260}$  –Faktor entspricht einem Wert von 40 µg/ml RNA. Die Reinheit der isolierten RNA-Probe wird durch das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) überprüft.

Bei einer reinen RNA-Probe liegt dieser Wert zwischen 1,5 und 2,0. Ein weiterer Anhaltspunkt für die Reinheit der gemessenen RNA-Probe liefert die Absorption bei Wellenlänge 320 nm; bei reinen Proben ist dieser Wert nahe Null.

#### **Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA**

Um zu prüfen ob die RNA-Präparation intakt ist, wurde eine denaturierende Gel-Elektrophorese durchgeführt. Zwei diskrete Banden für 18 S und 28 S ribosomale RNA zeigen eine intakte Präparation. Für die Herstellung des Denaturierungsgels wurde 1 g Agarose mit 10 ml 10x MOPS-Puffer, 73 ml DEPC-Wasser (0,1 %) für 1-2 min in der Mikrowelle aufgekocht.

Nach kurzem Abkühlen wurden 17 ml Formaldehyd (37%) und Ethidiumbromid dazugegeben und das Gel gegossen. Das Gel wurde für 30 min ausgehärtet. Vor dem Gellauf wurden 0,5-1 µg der aufgearbeiteten RNA in 8 µl Denaturierungslösung gemischt, für 5 min bei 65 °C erhitzt und anschließend für 2 min auf Eis gestellt. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden 2 µl Blaumarker zugesetzt. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte in einem 2% (w/v) Gel, wobei 1x MOPS-Puffer als Laufpuffer diente. Die RNA wurde durch UV-Licht sichtbar gemacht.

#### **2.2.7.2 RT-PCR (Reverse Transkriptase-PCR) und kompetitive RT-PCR**

Bei der RT-PCR erfolgt zunächst eine cDNA-Erststrangsynthese (RT-Reaktion), wobei die aus den HEK 293 Zellen isolierte Gesamt-RNA als Matrize dient.

Die Reverse-Transcriptase-Reaktion wird mit dem Kit: RevertAid™H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit nach Herstellerangaben durchgeführt.

Für die reverse Transkription von RNA in cDNA wurde eine MMLV-Reverse-Transcriptase, eine RNA-abhängige DNA Polymerase verwendet. Die benutzte RevertAid™ H Minus MMuLV Reverse Transcriptase hat durch eine Punktmutation ihre RNase H-Aktivität verloren und besitzt eine besonders hohe Syntheseleistung.

Für die RT-Reaktion benötigt man Primer, die an die RNA hybridisieren und anschließend von der Reverse Transcriptase mit dNTP's entlang der Matrize in 5' → 3'-Richtung zu einer cDNA verlängert werden. Dabei wurde „random hexamer“-Primer, Hexanukleotide unterschiedlicher Zusammensetzung, verwendet. Die Primer können aufgrund ihrer individuellen Sequenz an verschiedenen Stellen einer mRNA-Sequenz hybridisieren. Auf diese Weise erhält man eine vollständige, aus Einzelfragmenten bestehende, cDNA. In einer anschließenden PCR mit spezifischen Primern dient die cDNA als Matrize für die Amplifikation einer bestimmten Gen-Sequenz. Zur Quantifizierung der Mengen an exprimierter mRNA wird eine kompetitive RT-PCR durchgeführt. Das Prinzip der kompetitiven RT-PCR besteht darin, dass durch Zugabe eines internen RNA-Standards (mit unterschiedlichen Konzentrationen) in der RT-Reaktion sowohl native als auch Standard-cDNA synthetisiert wird.

In der anschließenden PCR mit sequenzspezifischen Primern dienen beide als Template und konkurrieren um die gleichen Primer. Bei der RT-Reaktion wurden jeweils **500** ng native RNA (der HEK 293 Zellen) mit verschiedenen, definierten Konzentrationen (1-500 pg) des internen RNA-Standards versetzt und die RT-PCR wie oben beschrieben

durchgeführt. Das in der PCR amplifizierte Standardfragment war um etwa 100 bp kürzer, als das native Fragment. Im Agarosegel konnten zwei Banden unterschiedlicher Größe identifiziert werden. Die Quantifizierung erfolgt dann über einen Vergleich der optischen Dichte der Banden aus nativer cDNA zu denen des unterschiedlich konzentrierten Standards. (Programm Gel Doc. von Bio Rad Laboratories/ 2000 Alfred Nobel Drive / Hercules, CA 94547/ Quantity One ® Version 4.1.1 The Discovery Series™). Die X-Achse entspricht der logarithmischen Auftragung der Quotienten aus optischer Dichte von nativer RNA-Bande zu Standardbande, die Y-Achse stellt die logarithmische Auftragung der unterschiedlichen Standardkonzentrationen dar. Es ergibt sich eine lineare Regression, wobei der Wert wo X=0 (d.h. Y-Achse schneidet) dem Logarithmus der gesuchten m-RNA-Konzentration entspricht.

### **2.2.7.3 Generierung des internen Standard-RNA-Fragmentes**

Zur Quantifizierung der mRNA-Expression wurde ein internes Standardfragment hergestellt. Dieses Fragment besteht, im Vergleich zur nativen RNA, aus einer um 100 bp verkürzten Sequenz, mit gleicher Anfangs- und Endsequenz, der durch In-vitro-Transkription in RNA umgewandelt wird. In einer Linker-Primer-PCR werden die jeweiligen Standard-Fragmente amplifiziert. Durch die Verwendung eines Linkerprimers, der aus dem 5'-Primer und einer Sequenz innerhalb des Genes besteht, erhält das Standard-Fragment die gleiche Anfangs- und Endsequenz wie das zu amplifizierende native RNA-Fragment. Demnach können die in der PCR eingesetzten Primer gleichermaßen an Standard und nativem Fragment binden.

Linker-Primersequenz: 37 bp

5'-GAA GAC ATC AAA AAA GAG GCA CCT CGC CAC CAT CTA C-3'

### **Standardklonierung**

Das in der PCR amplifizierte Standardfragment wurde mit dem TOPO-TA Cloning® Kit kloniert. Dabei wurden 2 µl des PCR-Produktes in der Ligationsreaktion eingesetzt. Die Ligationsreaktion sowie die anschließende Transformation in TOPO-Zellen wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Das neu entstandene Plasmid wurde durch Restriktionsanalyse auf seine Richtigkeit überprüft.

### **In-vitro-Transkription**

In vitro-Transkription bedeutet die Generierung von einzelsträngiger RNA aus klonierten doppelsträngigen DNA-Templates durch DNA-abhängige RNA-Polymerasen. Hier wird die T7-RNA-Polymerase benutzt. Diese Polymerase besitzt eine hohe Spezifität für den T7-Promotor, der in dem verwendeten Plasmidvektor (pCR®-TOPO®-Vektor) enthalten ist. Die RNA-Synthese erfolgt deshalb ausschließlich ausgehend vom T7-Promotor. Von diesem Startpunkt aus werden Sequenzen transkribiert die hinter diesem Promotor kloniert wurden. Das Standardplasmid wurde linearisiert (mittels Restriktionsendonucleasen SPE I).

Die Transkription wurde mit dem „RNA Transcription Kit“ laut Herstellerangaben durchgeführt.

### **2.2.8 Gewinnung von Zellhomogenaten**

Zur Gewinnung der Zellhomogenaten wurden die HEK 293 Zellen 2 x mit PBS gewaschen. Dann wurde die entsprechende Menge an Zell-Lysispuffer (3 ml/150 mm – und 1,5 ml/100 mm Petrischale) zugegeben und die Zellen mit dem Zellschaber von den Petrischalen abgelöst. Die Zellsuspension wurde in Falconröhrchen gesammelt und 4 x für je 10 s mit Ultraschall (150 W) sonifiziert.

### **2.2.9 Gewinnung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) aus HEK 293 Zellen**

Zur Aufreinigung der eNOS aus den HEK 293 Zellen wurde ein Zellhomogenat (s. 2.2.8) hergestellt. Nach der Lyse der Zellen wurde für 15 min bei 3.000 x g zentrifugiert und der so entstandene Überstand in vorgekühlte Falconröhrchen gesammelt. Die Aufreinigung erfolgte durch Affinitätschromatographie. Die 2'-5'-ADP-Sepharose 4B wurde in destilliertem Wasser zu Gel gequollen (1g gefriergetrocknetes Pulver ergab 3,5-5 ml Gel) und mit 200 ml destilliertem Wasser gewaschen. Vor dem Auftragen der Proben wurde das Sepharose-Gel in Poly-Prep®-Chromatographie-Säulen mit einem neutralen Puffer (NaCl 2,92 g pro 100 ml, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 889 mg pro 100 ml, pH 8,4) bei 4 °C äquilibriert. Der gesammelte Überstand der Zell-Zentrifugation wurde auf die Säulen gegeben und für 2 h in Kühlraum gelagert. Durch ständiges Durchmischen wurde das Protein an die 2'-5'-ADP-Sepharose 4B gebunden. Danach wurde 2 x mit 10 ml Puffer A (0,5 M Ethanolamin, 0,5 M NaCl, pH 8,3) und 2 x mit 10 ml mit Puffer B (0,5 M

NaCl, 0,1 M Natriumacetat pH 4) gewaschen. Der NADPH-Elutionspuffer wurde frisch hergestellt und das Protein mit 3 x 500 µl Elutionspuffer von dem Gel abgetrennt. Die so entstandenen Eluate entsprachen der aufgereinigten zytosolischen Fraktion.

Wurden die Säulen nicht sofort verwendet, wurden sie mit einer Aufbewahrungslösung (0,05 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,1% NaN<sub>3</sub>, pH 7) gefüllt und bei 4 °C gelagert.

### **2.2.10 Bestimmung der spezifischen Aktivität der endothelialen NO-Synthase**

Die Bestimmung der spezifischen Aktivität der endothelialen NO-Synthase (Bredt & Snyder, 1989) beruht auf der durch das Enzym katalysierten Umsetzung von <sup>14</sup>C-L-Arginin zu NO• und <sup>14</sup>C-L-Citrullin. Das nicht umgesetzte <sup>14</sup>C-L-Arginin bleibt auf der AG 50 W Resin-Säule zurück. Nur das radioaktiv markierte <sup>14</sup>C-L-Citrullin wird mit dem Counter erfasst.

Die Kofaktor-Stammlösungen wurden in folgenden Konzentrationen hergestellt:

4 U/µl Calmodulin (die gelieferten gesamten 100 000 Units wurden in 2,5 ml Cocktail-Puffer zu 40 U/µl gelöst und nochmals mit Cocktail-Puffer 1:10 zu 4 U/µl verdünnt); 10 mM L-Arginin; 110 mM CaCl<sub>2</sub>; 20 mM Citrullin; 0,2 mM FAD; 0,2mM FMN; 10 mM Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) wurden in N<sub>2</sub>-begastem Wasser gelöst; eine 20 mM NADPH-Lösung wurde jedes Mal frisch hergestellt.

Aus diesen Stammlösungen wurden Master-Mixe hergestellt, die 0, 1, 5, 10, 30, 50 µM BH<sub>4</sub> enthielten. Die anderen Kofaktoren waren in folgenden Endkonzentrationen enthalten: Calmodulin 0,1 U/µl, L-Arginin 100 µM, CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM, Citrullin 1 mM, FAD 4 µM, FMN 4 µM, NADPH 1 mM. Das Reaktionsvolumen betrug 200 µl. In 1,5 ml Eppendorf-Gefäßen wurden 39 µl Tris-Puffer (pH 7,5) gegeben. Zu dem Tris-Puffer wurden 46 µl des jeweiligen Master-Mixes und 15 µl <sup>14</sup>C-L-Arginin (50 µCi, 1,85 MBq, NEN, Boston, USA) zugegeben. Anschließend wurden 100 µl Zellhomogenat zugegeben und die Reaktion für 15 min bei 37 °C gestartet.

Während der Startreaktion wurden die Poly-Prep® Chromatographie-Säulen (BioRad, Hercules, CA, USA) mit genau 1 ml AG 50 W Resin (BioRad, Hercules, CA, USA) gefüllt. Das Resin war für mehrere Tage in Stop-Puffer äquilibriert worden. Danach wurden Szintillationsgefäße unter die Säulen gestellt. Anschließend wurden die mit 1 ml Stop-Puffer versetzten Reaktionsgemische auf die Säulen gegeben. Es wurde noch 2 x mit je 1 ml Stop-Puffer gewaschen und das Eluat (ca. 3 ml) mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit versehen und im Counter vermessen.



Die spezifische Aktivität der eNOS in pmol Citrullin/mg Protein/min wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{CPM} - \text{CPM-Leerwert}}{\text{CPM (100\% } ^{14}\text{C-L-Arginin)}} \times \frac{20000 \text{ (pmol zugesetztes kaltes L-Arginin)}}{\text{mg Protein} \times \text{Inkubationszeit}} = \text{pmol Citrullin}$$

Die Bestimmung der spezifischen Aktivität der endothelialen NO-Synthase war eine Zusammenarbeit mit Prof. Dr. D.G. Harrison, Atlanta, GA, USA und Fr. Dr. M. Weber.

### 2.2.11 Präparation der Aortensegmente von Ratten

Die im Rahmen dieser Studie durchgeführten Versuche an Ratten zur Bestimmung der spezifischen Aktivität der sGC und zur die Bestimmung der sGC-Expression wurden von der Regierung (O45/87) genehmigt. Die Experimente wurden nach den Richtlinien für den Umgang mit Versuchstieren laut Deutschem Tierschutzgesetz und „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“ (US Institute of Health) durchgeführt.

Es wurden thorakale Aortenringe von 4 Monate alten männlichen Wistar-Ratten untersucht. Zur Präparation der Aortensegmente wurden die Ratten mit CO<sub>2</sub> getötet und auf einem Präpariertisch fixiert. Das Fell wurde entfernt und mit einer Schere wurden der kaudale Anteil des Sternums und die Rippen durchtrennt um den Thorax zu eröffnen. Das so freigelegte Herz wurde mit einer Pinzette erfasst und die Aorta unmittelbar an ihrem Ursprung aus dem linken Ventrikel durchtrennt. Die Lunge und die Speiseröhre wurden entfernt und die Bauchorgane verlagert. Die Aorta wurde dann bis zu ihrer Aufzweigung im Beckenbereich freipräpariert. Das freipräparierte Gefäß wurde dann sofort in eine Petrischale mit kaltem Krebs-Hepes-Puffer gelegt und anschließend dreimal mit 1 ml Puffer durchgespült umso das Gefäßlumen von Blutresten zu reinigen. Danach wurde das anhaftende Fett- und Bindegewebe von der Aorta mittels Schere und Pinzette wegpräpariert. Während der Präparation der Aorta wurde jede mechanische Belastung des Gefäßes durch Dehnung, Quetschung oder Abknicken vermieden und möglichst nur das anhaftende Fett- und Bindegewebe mit der Pinzette angefasst. Einen Teil der Aortensegmente wurde sofort mit SPER/NO inkubiert. Der andere Teil wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C für nachfolgende Untersuchungen (Western Blot) gelagert.

### **2.2.12 Inkubation der Aortensegmente mit SPER/NO**

SPER/NO war ein Geschenk von Prof. L. Keefer, National Cancer Institute Frederick USA. Die Inkubation der Rattenaorten erfolgte mit dem NO-Donator, SPER/NO (200  $\mu\text{M}$ ), für insgesamt 4 h. Während der Inkubation wurde der Krebs-Hepes-Puffer alle 30 min ausgetauscht. Zu jeder Inkubation mit SPER/NO wurde parallel eine Inkubation zur Kontrolle unter gleichen Versuchsbedingungen, nur ohne Zugabe von SPER/NO, durchgeführt. Nach den Inkubationsversuchen wurden die Aorten in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **2.2.13 Herstellung einer zytosolischen Fraktion aus Aortensegmenten und Proteinbestimmung**

Die gefrorenen Aortenringe wurden mit einem mechanischen Zerkleinerer pulverisiert und in 2 ml kalten Gewebe-Lysis-Puffer mit dem Ultra-Turrax T8 homogenisiert. Danach wurde dreimal bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert, zunächst mit  $100 \times g$  für 10 min, dann der Überstand mit  $10.000 \times g$  für 15 min und dieser Überstand mit  $105.000 \times g$  für 1 h. Die so erhaltenen zytosolischen Fraktionen wurden ausaliquotiert, ihr Proteingehalt nach der Methode von Bradford bestimmt und bei  $-80^{\circ}$  eingefroren. Der Nachweis des Proteingehaltes beruht auf der Beobachtung von Bradford (Bradford et al., 1976), wonach das Absorptionsmaximum einer sauren Lösung von Coomassie Brilliant Blue, nach Ausbildung von Proteinkomplexen, von 465 nm zu 595 nm verschoben wird. Das Coomassie-Reagenz bindet an basische und aromatische Gruppen.

Zur Herstellung des Bradford Reagenz wurden 40 mg Coomassie Blue G mit einem Magnetrührer für 30 min bei  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  in 10 ml Ethanol (96 %) gelöst, anschließend 20 ml 85 %-ige Phosphorsäure ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) hinzugeben und mit Aqua bidest auf 200 ml aufgefüllt. Anschließend wurde das Gemisch mit einem Magnetrührer bei Raumtemperatur für 30-60 min gerührt. Danach wurde die Lösung durch ein Faltenpapier zweimal filtriert und damit in einen gebrauchsfertigen Zustand überführt. Die Messung des Proteingehaltes erfolgte durch Messung der Absorption in einem Photometer. BSA (Albumin aus Rinderserum) wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml in Tris-Puffer gelöst (Stammlösung). Die Stammlösung diente für die Verdünnungsreihe (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120 und 140  $\mu\text{g/ml}$  BSA in Tris-Puffer), die für die Messung benötigt wurde. Vor jeder Messung wurde zunächst in

verschiedenen Konzentrationen eine Kalibrierung vorgenommen. Jeweils 100 µl der BSA-Verdünnungsreihe wurden mit 400 µl Bradford-Reagenz versetzt, als Leerwert wurde Tris-Puffer genommen. Die lineare Regression und die Standardabweichung von den Messwerten wurden mit dem Computerprogramm "Graph Pad Prism 4" bestimmt. Unter denselben Bedingungen wurden dann von jeder der zu bestimmenden Proben 100 µl der Probe und 400 µl Bradford-Reagenz gemischt und in Halbmikroküvetten bei 595 nm vermessen.

Aus den gemessenen Extinktionen wurden nach der Formel:

$$C = \frac{E - a}{b} \times f$$

die Proteingehalte der einzelnen Proben in µg/ml berechnet, wobei

C= Proteingehalt, E= gemessene Extinktion, a = y-Achsenabschnitt, b= Steigung, f= Verdünnungsfaktor der Probe

#### **2.2.14 Bestimmung der spezifischen Aktivität der löslichen Guanylatzyklase**

Die spezifische Aktivität der sGC wurde nach der Methode von Schultz et. al. bestimmt (Schultz & Böhme, 1984).

Sie basiert auf der durch das Enzym katalysierten Bildung von  $\alpha^{32}\text{P}$ -cGMP aus zugesetztem radioaktiv-markiertem  $\alpha^{32}\text{P}$ -GTP. Über eine Aluminiumoxid-Säule wird das gebildete  $\alpha^{32}\text{P}$ -GMP gebunden und so kann  $\alpha^{32}\text{P}$ -GTP und  $\alpha^{32}\text{P}$ -cGMP voneinander getrennt werden. Anhand der Konzentration an gebildetem  $\alpha^{32}\text{P}$ -cGMP wird die Aktivität der sGC berechnet. Die folgenden Substanzen wurden auf Eis zusammenpipettiert. Zu einem Reaktionsgemisch (REA-Mix Gesamtvolumen: 40µl), der folgende Zusammensetzung hat: TEA-Puffer (50 mM, pH 7,4); IBMX (5 mM) als PDE-Inhibitor, BSA (0,5 mg/ml) als Stabilisator, cGMP (1 mM) und DTT (3 mM) als Antioxidans, wurde für jede Probe 40 µl der zytosolischen Fraktion von den Rattenaortenringen und ein Stimulator (NO-Donator für sGC) SNAP in der gewünschten Konzentration zugesetzt. Um eine SNAP-Dosiswirkungskurve zu erstellen, wurden jeweils 10 µl SNAP in den Konzentrationen 0-10 mM zum REA-Mix zugesetzt (EK: 0, 1, 10, 30, 100, 500, 1000 µM). Zu diesem ganzen Gemisch wurden  $\text{MgCl}_2$  (3mM) und GTP zugefügt. Zum Schluss wurden 0,5 mM  $\alpha^{32}\text{P}$ -GTP (spezifische

Aktivität 3-5 TBq/mmol) zu den 100 µl Endvolumen hinzupipettiert und die Reaktion gestartet. Nach exakt 12-minütiger Inkubation bei 37 °C im Wasserbad wurde die Reaktion durch gleichzeitige Zugabe von 400 µl wässriger Zinkacetatlösung (125 mM) und 500 µl wässriger Natriumcarbonatlösung (125 mM) gestoppt. Durch eine Zentrifugation der Proben für 10 min mit 8.000 x g bei 4 °C wurde die Zink-Carbonat-Fällung abgetrennt. Der Überstand wurde auf die mit 1 ml Aluminiumoxid gefüllten Säulen gegeben, die vorher mit 0,2 M Perchlorsäure gespült worden waren. Die Elution von  $\alpha^{32}\text{P}$ -cGMP erfolgte mit 10 ml wässriger Natriumacetatlösung (250 mM). Das Eluat wurde in Szintillationsgefäßen aufgefangen und direkt im Counter vermessen.

Die spezifische Aktivität der löslichen Guanylatzyklase in pmol cGMP/ mg Protein/min wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{CPM-CPM-Leerwert}}{\text{Säulenausbeute(\%)} \times \text{spez. Radioaktivität (TBq/mmol)}} = \frac{\text{pmol Citrullin}}{\text{mg Protein} \times \text{Inkubationszeit in mg/ 40 } \mu\text{l in min.}}$$

### 2.2.15 Bestimmung der Expression der löslichen Guanylatzyklase (sGC)

Die Analyse der Proteinexpression der sGC in den Aortensegmenten erfolgte mittels Western Blot. Das Prinzip des Western Blots besteht darin, dass Proteine durch Gelelektrophorese aufgetrennt werden, dann auf eine Membran transferiert bzw. gebロットet und danach durch Antikörperbindung und anschließender Detektion nachgewiesen werden.

#### **Auftrennung der Proteine**

Die Auftrennung der Proteine aus den zytosolischen Fraktionen erfolgte nach dem Prinzip der diskontinuierlichen, denaturierenden Gelelektrophorese (Laemmli, 1970; Neville 1971). Dazu wurden ein Trenngel und darauf ein Sammelgel gegossen. Als Ausgangsmaterial dienten frisch hergestellte Aortenhomogenate bzw. die eingefrorenen Aliquots. Als Kontrolle wurde die Guanylatzyklase aus humanen DEAE-Fraktionen verwendet. Zur Untersuchung der Proteine wurden verschiedene Mengen an

Gesamtprotein aus den zytosolischen Fraktionen eingesetzt. Die Proben wurden vor dem Beladen auf das Gel mit Probenpuffer im Verhältnis 1:1 oder mit mindestens 20% Probenpuffer versetzt, kurz gemischt, für 5 min bei 95°C denaturiert und auf das Gel geladen. Für den Probenpuffer wurden 220 µl Probenpuffer mit 220 µl Aqua Dest. und 60 µl 2-Mercaptoethanol versetzt. Der Gellauf erfolgte bei 150 V in einer Elektrophoresekammer mit 1x Tankpuffer für etwa 1 Stunde. Als Molekulargewichtsmarker diente ein Kaleidoskopmarker (BioRad, München)

### **Proteintransfer**

Nach 1 Stunde wurden die aufgetrennten Proteine in einer Blotting Apparatur vom Gel auf die Nitrocellulosemembran (Hybond ECL, Amersham Pharmacia Bioscience) transferiert. Der Transfer erfolgte für 1 Stunde bei 90 V in Westernblot-Puffer.

### **Absättigung unspezifischer Bindungen**

Zur Absättigung unspezifischer Bindungen wurde die Membran über Nacht bei 4°C in 6% Blocking-Milch in TBST-Puffer auf einer Wippe inkubiert. Am nächsten Tag wurde noch für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde dreimal für je 5 min mit TBST-Puffer gewaschen.

### **Antikörperinkubation**

**sGC-Antikörper:** Cayman Chemicals, Alexis, Grünberg; polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen, gerichtet gegen die  $\beta_1$ -Untereinheit der löslichen Guanylatzyklase; Verdünnung 1: 2500 in 3 % Blocking Milch (in TBST-Puffer), Inkubation für 2 h bei Raumtemperatur.

**eNOS-Antikörper:** BD Transduction Laboratories, Lexington, USA; monoklonaler Antikörper aus der Maus, gerichtet gegen das eNOS-Protein; Verdünnung 1:2000, Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur.

Nach den anschließenden 5x Waschphasen mit TBST-Puffer erfolgte eine Inkubation für 1 h mit einem Meerrettich-Peroxidase konjugierten Sekundarantikörper gegen Kaninchen- bzw. Maus-IgG (1:5000) (BioRad, München).

## **Detektion**

Nach einer weiteren Waschphase von 3 x 5 min mit TBST-Puffer wurden die Membranen zur Detektion der Proteine für ca. 5 min mit einem Detektionsreagenz (Lumi-Light Western Blotting Substrate) nach Herstellerangaben inkubiert.

Bei dieser Detektionsmethode wurde die Aktivität der Peroxidase gemessen. Hier kommt es zu Schwärzungen, welche durch Exposition der Membran auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm™ ECL™) belichtet und dann entwickelt wurde.

### **2.2.16 Statistik**

Alle biochemischen und funktionellen Methoden sowie die Ergebnisse dieser Arbeit sind angegeben als arithmetischer Mittelwert  $\pm$  SEM (Standardfehler des Mittelwertes), wobei n die Anzahl der dem Mittelwert zugrunde liegenden Versuche bezeichnet.

Bei Vergleichen zwischen drei oder mehreren Daten wurde durch eine Varianzanalyse (einfaktorieller ANOVA) mit integriertem Student-Newman-Keuls-Test auf signifikante Unterschiede getestet. Dabei wurde der Wert  $p < 0,05$  als signifikanter Unterschied gewertet und in den Diagrammen an der entsprechenden Stelle mit einem Sternchen [\*] markiert.

Alle Messdaten wurden mit dem Statistik-Computerprogramm Graph Pad Prism®, Version 4.1 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA) durchgeführt.

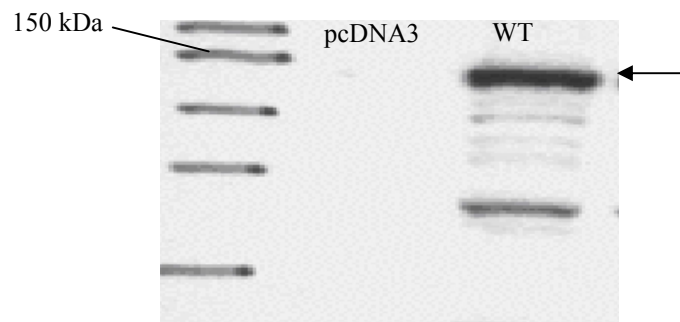
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Expression von WT-eNOS in HEK 293 Zellen

Nach der Transfektion der HEK 293 Zellen mit dem eNOS-Plasmid (WT) und dem pcDNA3 Vektor als Kontrolle wurde eine stabile Zelllinie etabliert (s. 2.2.4).

Nach Zugabe von 800 µg/ml G418 Sulfat zum Nährmedium starben die nicht-transfizierten Zellen ab, die überlebenden Zellen, die entweder mit dem pcDNA3 Vektor oder mit dem eNOS-Plasmid transfiziert waren, wurden weiter gezüchtet.

Die Expression der eNOS wurde in einem Western Blot mit eNOS-Antikörper geprüft.



**Abb. 7** repräsentative Darstellung eines Western-Blots: Expression der eNOS nach Vektor (pcDNA3) und Wildtyp (WT)-Transfektion

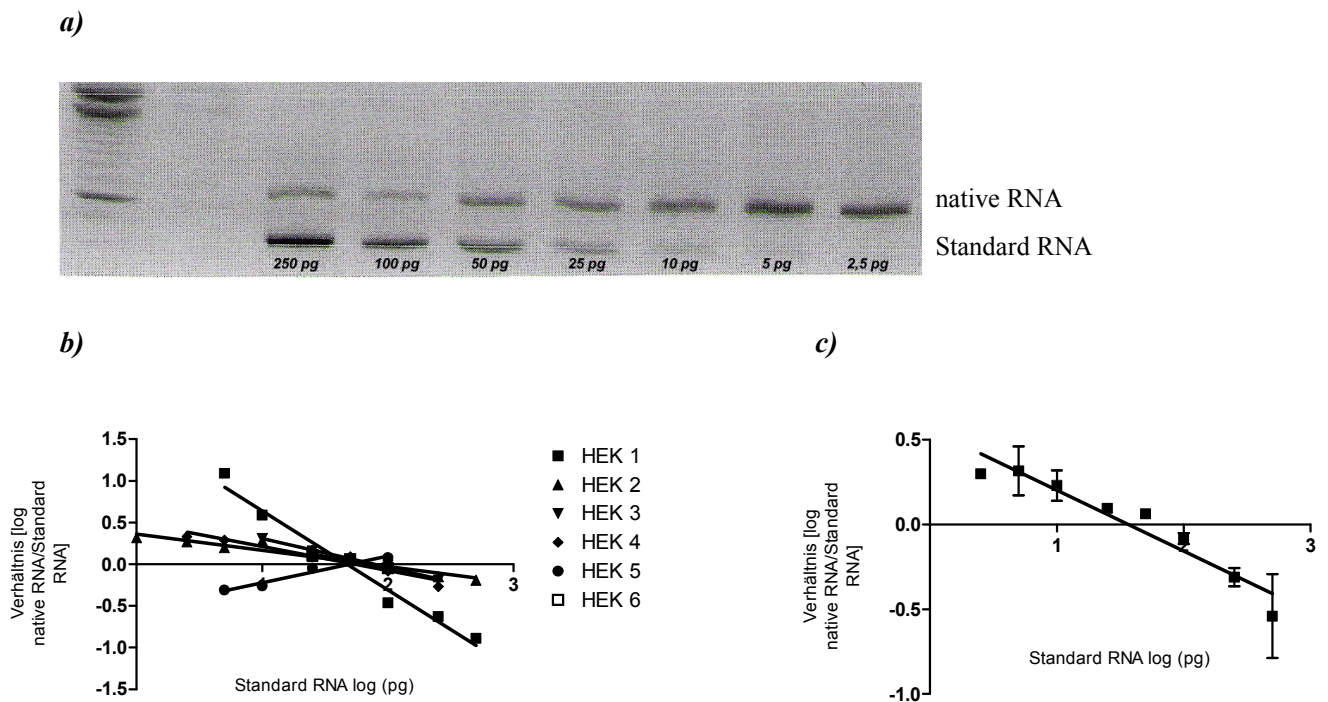
Die mit dem pcDNA3 Vektor stabil transfizierten HEK 293 Zellen, die zur Kontrolle dienten, zeigten keine eNOS-Expression. Die mit dem eNOS-Plasmid stabil transfizierten HEK 293 Zellen (WT) zeigten die eNOS-Bande (Pfeil) bei 140 kDa.

#### 3.2 Einfluss von NO auf die mRNA-Expression der löslichen Guanylatzyklase

Um die Wirkung von NO auf die Expression der sGC zu studieren wurde die sGC-mRNA quantifiziert. Hierbei wurden Untersuchungen an einem *in vitro*-Modell, den „Human embryonal kidney cells“ (HEK 293 Zellen), durchgeführt. Für die Versuche wurde der mRNA-Gehalt der sGC in normalen HEK 293 Zellen, in DETA/NO inkubierten HEK 293 Zellen, in vektor-transfizierten HEK 293 Zellen mit einem Vektor (pcDNA3) und in vektor-transfizierten HEK 293 Zellen mit einem bovinen eNOS Plasmid (WT) mittels einer kompetitiven RT-PCR bestimmt.

### 3.2.1 mRNA- Expression der sGC in normalen HEK 293 Zellen

Den normalen HEK 293 Zellen fehlt die endogene eNOS (Sessa et al., 1995). So produzieren die HEK 293 Zellen nur niedrige NO-Konzentrationen. Die Auswertung der kompetitiven RT-PCR von insgesamt 6 Versuchen ergab eine mRNA der sGC von  $62,46 (\pm 5,40)$  pg/ml (**Abb. 8**).



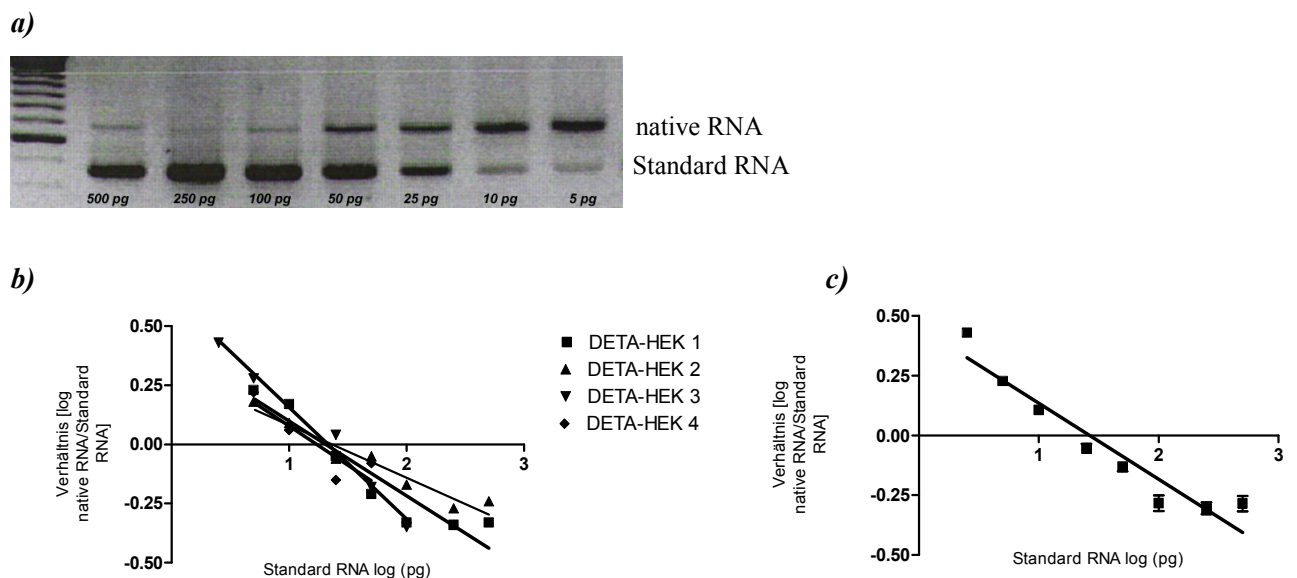
**Abb. 8** Quantitative Auswertung der sGC mRNA-Expression in nicht transfizierten HEK 293 Zellen

- a) repräsentative Darstellung eines Agarosegels einer kompetitiven RT-PCR für sGC von HEK 293 Zellen
- b) mRNA-Expression der sGC nach Densitometriebestimmung.  
Das Verhältnis der optisch-densitometrischen Werte für native RNA- und Standard RNA-Banden wurde für jede Standard-Konzentration berechnet und gegen die Menge an Standard-mRNA aufgetragen. Einzeldaten aus  $n=6$
- c) mRNA-Expression der sGC nach Densitometriebestimmung.  
Das Verhältnis der optisch-densitometrischen Werte für native RNA- und Standard RNA-Banden wurde für jede Standard-Konzentration berechnet und gegen die Menge an Standard-mRNA aufgetragen. Arithmetischer Mittelwert  $\pm$  SEM,  $n=6$



### 3.2.2 mRNA- Expression der sGC in DETA/NO inkubierten HEK 293 Zellen

Da die normalen HEK 293 Zellen keine eNOS besitzen, wurden den HEK 293 Zellen „exogenes“ NO zugeführt, indem sie für 6 h mit DETA/NO, einem spontanen NO-Donator, inkubiert wurden. Diese Versuche wurden durchgeführt um zu überprüfen welchen Einfluss eine Inkubation mit mikromolaren NO-Donator-Konzentrationen (100  $\mu$ M) auf den Regulationsmechanismus der sGC hat (**Abb. 9**). Aus insgesamt 4 Versuchen zeigte sich ein mRNA-Wert von 20,66 ( $\pm$  1.26) pg/ml. Im Vergleich zu den normalen HEK 293 Zellen kommt es durch die Inkubation der HEK 293 Zellen mit DETA/NO zu einer deutlichen Reduzierung des mRNA-Gehaltes der sGC.



**Abb. 9** Quantitative Auswertung der sGC mRNA-Expression in DETA/NO inkubierten HEK 293 Zellen

**a)** repräsentative Darstellung eines Agarosegels einer kompetitiven RT-PCR für sGC von DETA/NO inkubierten HEK 293 Zellen

**b)** mRNA-Expression der sGC nach Densitometriebestimmung.

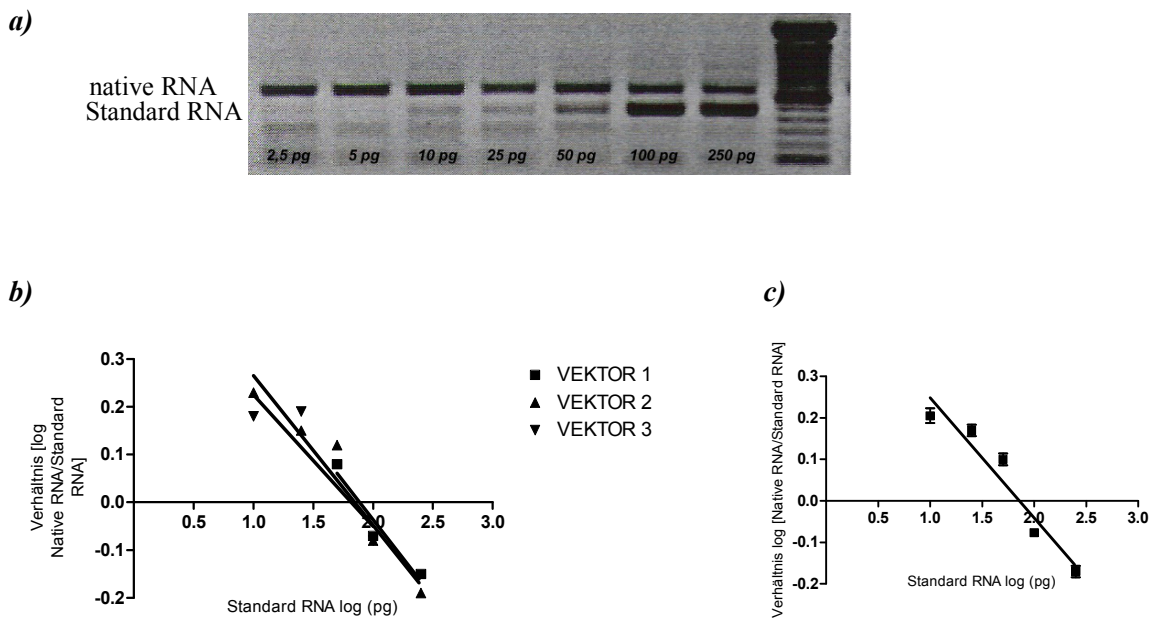
Das Verhältnis der optisch-densitometrischen Werte für native RNA- und Standard RNA-Banden wurde für jede Standard-Konzentration berechnet und gegen die Menge an Standard-mRNA aufgetragen. Einzeldaten aus n=4

**c)** mRNA-Expression der sGC nach Densitometriebestimmung.

Das Verhältnis der optisch-densitometrischen Werte für native RNA- und Standard RNA-Banden wurde für jede Standard-Konzentration berechnet und gegen die Menge an Standard-mRNA aufgetragen. Arithmetischer Mittelwert  $\pm$  SEM, n=5

### 3.2.3 mRNA-Expression der sGC in vektor-transfizierten HEK 293 Zellen

Weitere Untersuchungen wurden an transfizierten HEK 293 Zellen durchgeführt. Zur stabilen Transfektion in den HEK 293 Zellen wurde ein „leerer“ pcDNA3-Vektor verwendet, der zur Kontrolle diente (**Abb. 10**). Hierbei zeigte sich ein Wert von 71,11 ( $\pm 3,35$ ) pg/ml. Der sGC mRNA Gehalt in vektor-transfizierten HEK 293 Zellen ist ungefähr vergleichbar mit dem von normalen HEK 293 Zellen (ohne Transfektion).



**Abb. 10** Quantitative Auswertung der sGC mRNA-Expression in vektor-transfizierten HEK 293 Zellen

**a)** repräsentative Darstellung eines Agarosegels einer kompetitiven RT-PCR für sGC von vektor-transfizierten HEK 293 Zellen

**b)** mRNA-Expression der sGC nach Densitometriebestimmung.

Das Verhältnis der optisch-densitometrischen Werte für native RNA- und Standard RNA-Banden wurde für jede Standard-Konzentration berechnet und gegen die Menge an Standard-mRNA aufgetragen. Einzeldaten aus  $n=3$

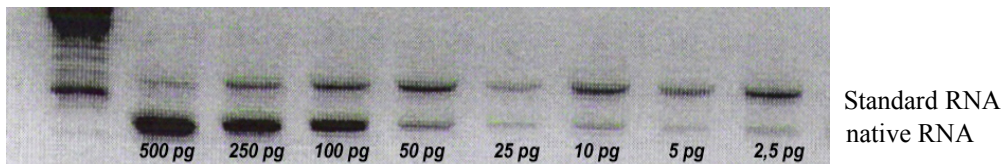
**c)** mRNA-Expression der sGC nach Densitometriebestimmung.

Das Verhältnis der optisch-densitometrischen Werte für native RNA- und Standard RNA-Banden wurde für jede Standard-Konzentration berechnet und gegen die Menge an Standard-mRNA aufgetragen. Arithmetischer Mittelwert  $\pm$  SEM,  $n=5$

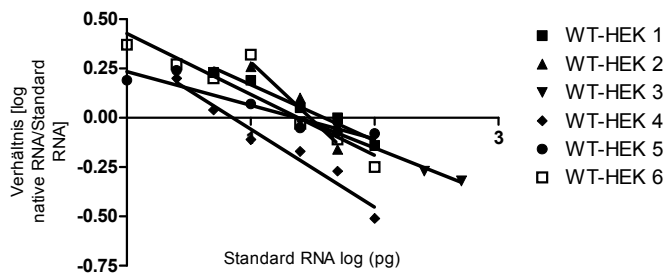
### 3.2.4 mRNA-Expression der sGC in eNOS-transfizierten HEK 293 Zellen

Da den HEK 293 Zellen normalerweise die eNOS fehlt, wurde durch eine stabile Transfektion ein pcDNA3-Vektor mit einem bovinen eNOS Plasmid in die Zellen eingesetzt, um eine endogene NO-Produktion auszulösen (**Abb.11**). Im Vergleich zu den vektor-transfizierten HEK 293 Zellen zeigte sich eine Erniedrigung des mRNA-Gehaltes der sGC. Die Auswertung der kompetitiven RT-PCR von insgesamt 6 Versuchen ergab einen sGC- mRNA Wert von 24,87 ( $\pm$  4,27) pg/ml.

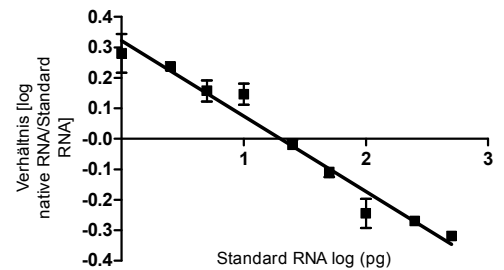
a)



b)



c)



**Abb. 11** Quantitative Auswertung der sGC mRNA-Expression in WT-HEK 293 Zellen.

a) repräsentative Darstellung eines Agarosegels einer kompetitiven RT-PCR für sGC von Wildtype (WT) HEK 293 Zellen

b) mRNA-Expression der sGC nach Densitometriebestimmung.

Das Verhältnis der optisch-densitometrischen Werte für native RNA- und Standard RNA-Banden wurde für jede Standard-Konzentration berechnet und gegen die Menge an Standard-mRNA aufgetragen. Einzeldaten aus n=6

c) mRNA-Expression der sGC nach Densitometriebestimmung. Das Verhältnis der optisch-densitometrischen Werte für native RNA- und Standard RNA-Banden wurde für jede Standard-Konzentration berechnet und gegen die Menge an Standard-mRNA aufgetragen.

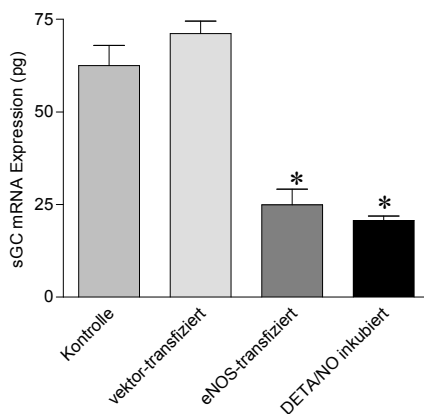
Arithmetischer Mittelwert  $\pm$  SEM, n=6

## Messung der Aktivität gereinigter WT-eNOS

Die Bestimmung der spezifischen Aktivität der endothelialen NO-Synthase beruht auf der durch das Enzym katalysierten Umsetzung von  $^{14}\text{C}$ -L-Arginin zu  $\text{NO}\bullet$  und  $^{14}\text{C}$ -L-Citrullin (s. 2.2.10). Die Bestimmung der spezifischen Aktivität der endothelialen NO-Synthase war eine Zusammenarbeit mit Prof. Dr. D.G. Harrison, Atlanta, GA, USA und diese Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Martina Weber durchgeführt. Die gemessene Aktivität der aufgereinigten isolierten eNOS in Zellhomogenaten der WT-HEK 293 Zellen betrug:  $927\pm 312$  pmol Citrullin/mg Protein/min.

### 3.3 Einfluss von NO auf die Expression der mRNA in verschiedenen HEK 293-Zelllinien

In diesen Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass es zu einer deutlichen Herunterregulation der sGC auf mRNA-Ebene kommt; sei es durch exogen zugeführtes NO bei den Inkubationen der HEK 293 Zellen mit DETA/NO oder durch endogen produziertes NO, durch Transfektion eines bovinen eNOS-Plasmides in die HEK 293 Zellen (WT-eNOS transizierten Zellen) (**Abb.12**).



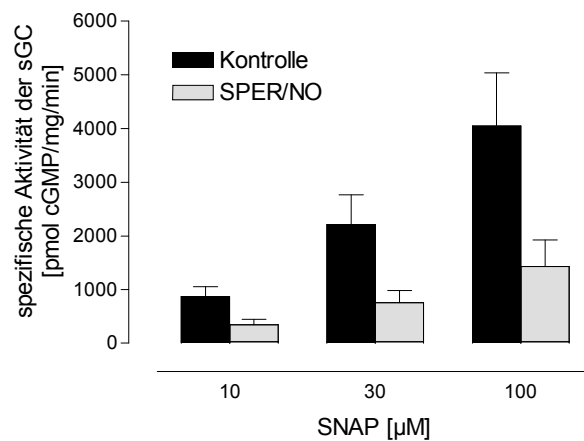
**Abb. 12 Effekt von NO auf die mRNA-Expression**

mRNA-Expression der sGC in unterschiedlichen HEK-Zellreihen

Quantitative Auswertung n=5, \*,  $p < 0,05$  versus Kontrolle (HEK 293 Zellen)

### 3.4 Einfluss von NO auf die Aktivität der löslichen Guanylatzyklase

In weiteren Versuchen wurde der Effekt von NO auf die Aktivität der löslichen Guanylatzyklase *in vitro* untersucht. Hierzu wurden glatte Muskelzellen aus Aorten von männlichen Wistar-Ratten genommen. Die Aortenringe wurden mit 200  $\mu\text{M}$  SPER/NO, einem spontanen NO-Donator, für 4 h inkubiert. Parallel dazu wurde eine Inkubation zur Kontrolle unter gleichen Versuchsbedingungen, nur ohne Zugabe von SPER/NO, durchgeführt. Die Aktivität der sGC wurde durch die Inkubation mit NO deutlich reduziert.

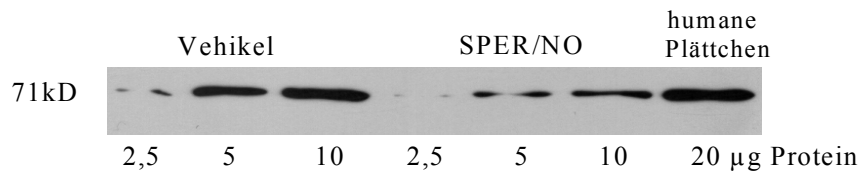


**Abb. 13** Die sGC-Aktivität in 105.000 x g Überständen aus Kontrolle und SPER-NO-behandelten Segmenten der Rattenaorten

Die cGMP-Bildungsrate lag bei den unbehandelten Aorten (Kontrolle) bei  $4040,85 \pm 992$  pmol cGMP/mg/min gegenüber  $1429,14 \pm 490$  pmol cGMP/mg/min bei den behandelten Aortenringen mit SPER/NO.

### 3.5 Einfluss von NO auf die Expression der löslichen Guanylatzyklase

Der Einfluss einer Inkubation mit 200  $\mu$ M SPER/NO für 4 h auf die Expression der sGC wurde parallel zur Aktivitätsbestimmung durchgeführt.



**Abb. 14** repräsentative Darstellung eines Western-Blots

Die Expression der sGC in Aortenringen der Ratte vor und nach Inkubation mit SPER-NO. Die mit einem Vehikel inkubierten Aortenringe, die zur Kontrolle dienten, zeigten eine höhere sGC-Expression (dickere Banden), als die Aortenringe, die mit 200  $\mu$ M SPER/NO für 4 h inkubiert wurden. Die Auswertung von insgesamt 5 Versuchen ergab eine Reduktion der sGC-Expression auf  $61,8 \pm 6,1$  % ( $P < 0.01$ ) kDa.

Durch eine Inkubation mit dem NO-Donator, SPER/NO, kam es zu einer deutlichen Erniedrigung der sGC-Expression.

## **4. Diskussion**

Im ersten Teil der Diskussion werden die unterschiedlichen Nachweisverfahren, die in dieser Arbeit zur Untersuchung des Regulationsmechanismus der sGC durch NO angewandt wurden, analysiert.

Im zweiten Teil werden die Ergebnisse dieser Arbeit mit anderen Studien zu diesem Thema verglichen und diskutiert.

### **4.1 Diskussion der Methoden**

#### **4.1.1 kompetitive RT-PCR**

Zum Nachweis von mRNA gibt es unterschiedliche Verfahren. Neben Northern Blot, RNase Protection Assays (RPA) und In-Situ Hybridisierung (INH) ist das häufigste angewandte Verfahren, die RT-PCR. Northern Blot, RPA und INH sind spezifische Verfahren zur Quantifizierung der mRNA-Expression, sie sind jedoch im Gegensatz zur RT-PCR zeitintensiv und oft schwer standardisierbar. Die RT-PCR ist unter den genannten Verfahren die sensitivste Methode zur Quantifizierung der mRNA-Expression, auch bei kleinen Probengrößen, die nur geringe Mengen an mRNA exprimieren. Seit der Entdeckung der RT-PCR (Saiki et al., 1985; Saiki et al., 1988) wurden viele Verfahren etabliert, die den mRNA-Gehalt bestimmen, darunter semi-quantitative und quantitative Methoden (Gilliland et al., 1990).

In dieser Arbeit wurde der Regulationsmechanismus der sGC durch NO auf mRNA-Ebene mittels einer quantitativen Methode, der kompetitiven RT-PCR analysiert.

Dabei wurde die Gesamt – RNA, die aus den HEK 293 Zellen isoliert wurde, zunächst mittels des Enzyms Reverse Transkriptase (RT) in die komplementäre DNA (cDNA) überführt. Die cDNA-Synthese wurde in einem PCR-Block (Cycler) durchgeführt, der konstante Temperaturbedingungen gewährleistet. Zur Sicherstellung identischer Bedingungen für die RT-PCR wurden immer das gleiche Kit eines Herstellers eingesetzt und stets dieselben Reagenzienmischungen für die jeweiligen Proben verwendet. Für die Isolation der Gesamt-RNA aus den HEK 293 Zellen wurde mit RNase freien Plastikmaterialien, DEPC-behandeltem Wasser und Handschuhen gearbeitet um das Kontaminationsrisiko zu vermeiden. Verunreinigungen der Proben mit RNAsen während der Probenverarbeitung sind ein entscheidender Faktor, der die

Validität beeinflussen könnte. Die Isolierung der Gesamt-RNA wurde mittels TRI Reagenz® durchgeführt. Das Kit unterliegt zur Gewährleistung eines gleich bleibenden Qualitätsstandards einer strengen Kontrolle durch den Hersteller.

Die mRNA ist ein relativ instabiles Molekül. Innerhalb einer intakten Zelle wird die mRNA ständig aufgebaut, mit Hilfe der Ribonukleasen kommt es nach der Translation zu einem raschen Zerfall der mRNA und somit zu einer resultierenden Begrenzung des posttranslatierten Proteins. Demnach könnte der rasche Abbau der mRNA in den Zellen die Validität beeinflussen. Um den raschen mRNA-Abbau zu limitieren und die möglichen Störfaktoren zu minimieren, ist zum Nachweis von mRNA eine rasche Probenverarbeitung von großer Bedeutung.

Kritisch muss auch die Aufbewahrungszeit der Zellen bei -80°C betrachtet werden, da bei diesen Bedingungen im Laufe der Zeit RNA-Degradationen auftreten können. Durch die Lagerung kann auch nicht sicher ausgeschlossen werden, dass keine Temperaturschwankungen stattgefunden haben, die das Material eventuell teilweise aufgetaut haben könnten und so das Kontaminationsrisiko erhöht und zu erheblichen Variationen in den zu resultierenden Expressionsergebnissen geführt haben könnte.

Zur Quantifizierung der Mengen an exprimierter mRNA wird durch Zugabe eines internen RNA-Standards (mit unterschiedlichen Konzentrationen) in der RT-Reaktion sowohl native, als auch Standard-cDNA synthetisiert. In der anschließenden PCR mit sequenzspezifischen Primern dienen beide als Template und konkurrieren um die gleichen Primer. Das Prinzip der kompetitiven RT-PCR besteht darin, dass über die Co-Amplifikation einer Proben-Verdünnungsreihe (enthält Proben-DNA) und einer Verdünnungsreihe eines internen Kompetitors (enthält Standard) in der die beiden miteinander konkurrieren, die Menge an Ziel-DNA ermittelt wird.

Ein Vorteil der kompetitiven RT-PCR ist vor allem, dass Eich- und Nativ-RNA in einem Ansatz sind und von allen möglichen Einflussfaktoren gleichermaßen beeinflusst werden. Nachteilig erweist sich jedoch eine aufwändigere und zeitintensivere Durchführung. Bei dieser Methode werden Effizienzunterschiede zwischen der Ziel-DNA und dem Standard nicht erfasst, was die Angabe absoluter Werte erschwert. (Bustin, 2000). Anschließend kommt nach der PCR zum Nachweis des PCR-Produktes eine Agarose-Gel-Elektrophorese mit Ethidium-Bromid-Färbung zum Einsatz. Diese Methode hat den Nachteil, dass es arbeits- und zeitintensiv ist und darüber hinaus ein mögliches Risiko für eine Kontamination trägt (Overbergh et al., 1999; Giulietti et al., 2001).



Einen neuen Ansatz stellt die so genannte real-time-PCR dar. Die real-Time-PCR ist ein schnelles und vollautomatisiertes Verfahren zum Nachweis von mRNA.

In einem geschlossenen System werden Amplifikation, Quantifizierung und Detektion in einem Schritt durchgeführt (Gibson et al, 1996; Heid et al., 1996).

Das unterscheidet sich somit von der kompetitiven RT -PCR, bei der man erst nach Ablauf der PCR quantitativ auswertet. Eine gelelektrophoretische Auftrennung ist bei der Real-Time-PCR nicht nötig. So sind die Daten sofort verfügbar und das Kontaminationsrisiko durch die fehlenden post-PCR Manipulationen sind somit vermeidbar. Das real-Time Verfahren erlaubt eine direkte software-gesteuerte Detektion in der log-linearen Phase der Reaktion mit Fluoreszenzfarbstoffen oder fluoreszenzmarkierten Sonden. Die Fluoreszenzfarbstoffen oder fluoreszenzmarkierten Sonden binden an bestimmten Schritten des PCR-Zyklus an die Ziel- DNA. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu, was eine Quantifizierung möglich macht. Die Quantifizierung wird an so genannten „crossing points“ gemessen, die durch die Software bestimmt werden und sich in der log-linearen Phase befinden.

Es können unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe und Sonden zur Anwendung kommen. SYBR Green ist ein nicht gekoppelter Fluoreszenzfarbstoff, der an jede Doppelstrang-DNA bindet (Morrison et al., 1998).

Die Taqman-Sonden (Holland et al. 1991), Hybridisierungssonden (Wittwer et al., 1990) und molecular beacons (Tyagi & Kramer, 1990) hingegen sind für die Ziel-DNA sequenz-spezifische Oligonukleotide, die mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind.

Im Vergleich zur Gel-Elektrophorese und Ethidium-Bromid-Färbung bei der kompetitive RT-PCR zeigt die Detektion mit Fluoreszenzfarbstoffen bei der real-Time-PCR eine höhere Sensitivität (Hein et al., 2001).

In jeder quantitativen RT-PCR wie z.B. die kompetitive RT-PCR oder auch die real-time PCR können spezifische Störfaktoren wie Unterschiede in der Ausgangsmenge der RNA sowie Unterschiede in der reversen Transkription oder den PCR-Effizienzen über den exponentiellen Prozess zu wesentlichen Variationen der individuellen Ergebnisse und damit zu einer Missinterpretation der ermittelten Expressionsprofile führen.

Die mRNA-Expression korreliert jedoch nicht immer mit der Menge an Protein (Benveniste et al., 1998). Eine mögliche Diskrepanz zwischen der gemessenen mRNA-Expression und der Protein-Expression kann durch verschiedene, post-transkriptionelle und post-translationelle Faktoren beeinflusst sein und sollte immer bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden (Overbergh et al., 2003).

#### 4.1.2 Western-Blot

Der Einfluss von NO auf die sGC- Proteinexpression wurde an zytosolischen Fraktionen von Rattenaortensegmenten mittels Western Blots untersucht.

Zunächst wurden mit Hilfe einer Gel-Elektrophorese die zytosolischen Fraktionen der Aortensegmente aufgetrennt. Nach dem Transfer (Elektrophorese) der Proteine auf die Nitrocellulose Membran mussten zuerst die freien Bindungsstellen auf der Membran blockiert werden, da sich sonst Antikörper bilden könnten und so einen spezifischen Nachweis von Antigenen unmöglich machen würden; dies erfolgt mit einer Milchpulverlösung (6% Blocking-Milch in TBST-Puffer). Anschließend konnten die Proteinbanden auf der Membran mit Hilfe spezifischer Antikörper (monoklonal oder polyklonal) identifiziert werden. Unspezifisch gebundene Antikörper wurden durch Waschvorgänge mit Puffern, die Detergentien enthalten, wieder entfernt. Bei der Verwendung monoklonaler Antikörper, die spezifisch nur ein Epitop am Protein erkennen, können Probleme auftreten. In dieser Arbeit wurde deswegen ein polyklonaler Antikörper, gerichtet gegen die  $\beta_1$ -Untereinheit der löslichen Guanylatzyklase, verwendet. Als Sekundär-Antikörper diente ein mit Meerrettichperoxidase gekoppeltes Anti-Rabbit Immunglobulin, dessen Antikörper spezifisch gegen bestimmte Bereiche des ersten Antikörpers gerichtet sind. Die Meerrettichperoxidase katalysiert die Umsetzung von Luminol (bzw. dessen Derivate) in seine oxidierte Form und kann so bei der Lumineszenz erfasst werden. Um eine falsch positive Markierung der Nitrozellulose-Membran auszuschließen, wurden Kontrollen unter Auslassung des primären Antikörpers durchgeführt, welche sämtlich negativ waren. Unter Auslassung sowohl des primären als auch des sekundären Antikörpers, d.h. nur unter Verwendung der Chemilumineszenzreagenzien zeigten sich die Kontrollen ebenfalls negativ. Eine falsch positive Markierung der Membran durch die Antikörper oder das Chemilumineszenz-Detektionssystem konnte also ausgeschlossen werden.

Der Western Blot ist eine relativ aufwändige und zeitintensive Methode mit einer guten Sensitivität und Spezifität. Bei diesem Nachweisverfahren wird das Molekulargewicht ermittelt und somit die Differenzierung verschiedener Antigen determinanten festgestellt. (Burnett, 1981). Bei der Interpretation der Ergebnisse ist zu beachten, dass natürliche Autoantikörper mit erfasst werden können oder Antigene mit sehr ähnlichen Molekulargewichten nicht differenziert werden können (Towbin et al., 1979).

Bei der Interpretation der Ergebnisse sollten mögliche Unterschiede zwischen dem mRNA-Gehalt und der Protein-Expression mit in Betracht gezogen werden.

Hier könnten posttranskriptionelle Mechanismen, welche die Rate der Proteintranslation kontrollieren sowie posttranslationelle Mechanismen, welche die Genexpression und die Halbwertszeit von Proteinen kontrollieren, eine wichtige Rolle spielen (Varshavsky, 1996). Während der Probenvorbereitung könnten weitere Faktoren wie z.B. die Proteolyse die Ergebnisse entscheidend beeinflusst haben.

#### **4.1.3 Aktivitätsbestimmung**

Die Aktivität der sGC wird anhand der Konzentration an gebildetem  $\alpha^{32}\text{P}$ -cGMP berechnet. Die sGC Aktivität, die aus dem Überstand der zytosolischen Fraktionen bestimmt wurde, spiegelt die zelluläre Aktivität nur bedingt wieder.

Es stehen weitere Nachweisverfahren zur Bestimmung der sGC-Aktivität zur Verfügung z.B. cGMP-Assays oder die VASP-Phosphorylierung.

Beim cGMP-Assay kann die sGC-Aktivität über Radioimmunoassay (RIA) oder über Enzymimmunoassay (EIA) bestimmt werden.

Der RIA ist ein immunologisches Nachweisverfahren, das auf einer Radioaktivitätsmessung basiert. Das Messprinzip beruht auf einer Konkurrenz zwischen radioaktiv-markiertem cGMP und cGMP aus dem Zelllysate um die Bindung an einen Antikörper mit hoher Spezifität und Affinität zu cGMP.

Beim EIA erfolgt die Bestimmung mittels einer enzymatischen Farbreaktion (z.B. Fluoreszenz, Chemolumineszenz oder Farbumschlag). Dieses Nachweisverfahren arbeitet auf der Grundlage des Wettbewerbs zwischen dem Enzym-Konjugat und der cGMP in der Probe für eine begrenzte Zahl von Bindungsstellen. Auf einer 96-well-Mikrotiterplatte werden spezifische cGMP-Antikörper immobilisiert, um deren limitierte Bindungsstellen freies, aus dem Zellüberstand gewonnenes und an Acetylcholinesterase gekoppeltes, cGMP konkurriert. Nach Beendigung der Reaktion werden die ungebundenen Reagenzien ausgewaschen. Die Acetylcholinesterase-Aktivität wird mit Ellmanns Reagenz bestimmt. Dabei katalysiert das Enzym die Bildung der 5-Thio-2-nitrobenzoesäure, deren Extinktion bei 412 nm vermessen werden kann. Die Extinktion ist proportional zu der Konzentration an freiem cGMP (Pradelles et al. 1989).

Ein weiteres Nachweisverfahren stellt die VASP-Phosphorylierung dar.

VASP (Vasodilatator-Stimuliertes Phosphoprotein) ist ein 46 kDA großes membranassoziertes, regulatorisches Aktin-bindendes Protein, ein Substrat der Proteinkinasen (PK) und gehört zur Gruppe der Ena/VASP Proteine.

Auf dem VASP-Protein wurden 3 Phosphorylierungsstellen (Serin<sub>157</sub>, Serin<sub>239</sub> und Threonin<sub>278</sub>) nachgewiesen, wobei Serin<sub>157</sub> primär von der cAMP-abhängigen PK phosphoryliert wird. Serin<sub>239</sub> hingegen wird primär von der cGMP-abhängigen PK phosphoryliert. In der phosphorylierten Form wird es auch P-VASP bezeichnet.

Unter dem Einsatz spezifischer Antikörper gegen das phosphorylierte Serin<sub>239</sub> kann über den Phosphorylierungsgrad Aufschluss über die Aktivität des NO-cGMP-Weges gewonnen werden (Smolenski et al., 1998). Die VASP-Phosphorylierung in der Gefäßwand spiegelt sehr gut die NO-Bioverfügbarkeit wieder. NO führt über eine Aktivierung der sGC zur gesteigerten Produktion von cGMP. Das cGMP führt über eine cGMP-abhängige PK I zur Phosphorylierung von VASP. Somit kann die VASP-Phosphorylierung als biochemischer Marker für den Aktivitätsgrad des NO•/cGMP-Signalweg gesehen werden.

## 4.2 Diskussion der Ergebnisse

Die lösliche Guanylatzyklase (sGC), ein heterodimeres Hämprotein ist der wichtigste intrazelluläre Rezeptor für NO. sGC vermittelt so eine Vielzahl physiologischer Prozesse des Signalmoleküls NO, von denen die Vasodilatation einer der wichtigsten Prozesse darstellt. Durch die Umwandlung von cGMP aus GTP reguliert die sGC die Steuerung verschiedener cGMP-assoziierter Effektorsysteme wie Proteinkinasen, Ionenkanäle und Phosphodiesterasen.

Ziel dieser Arbeit war es die verschiedenen Aspekte des NO•-cGMP-Signaltransduktionsweges darzustellen. Dabei wurde das zentrale Enzym dieses Signalweges, die sGC und die Regulation der sGC durch NO näher untersucht.

Es sollte der Einfluss einer Erhöhung der Bioverfügbarkeit von sowohl exogenem als auch endogenem NO auf die Expression (mRNA- und Proteinebene) und die Aktivität der sGC bestimmt werden.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde anhand von HEK 293 Zellen die Regulation der Expression der sGC durch NO auf mRNA-Ebene untersucht.

Sessa et al. (1995) konnten in einer Studie zeigen dass, den normalen HEK 293 Zellen die endogene eNOS fehlt. Sie exprimieren jedoch sGC und produzieren eine niedrige

Konzentration einer anderen Isoform der NOS, was indirekt durch erhöhte cGMP-Spiegel über die Stimulation mit  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilisierenden Substanzen nachgewiesen wurde (Bischof et al., 1997). Da den normalen HEK 293 Zellen die endogene eNOS fehlt, wurden in dieser Arbeit die Zellen mit boviner eNOS transfiziert umso eine erhöhte NO-Verfügbarkeit durch eine endogene NO-Produktion zu erzielen. Zur Kontrolle dienten normale HEK 293 Zellen, denen ein leerer Vektor transfiziert wurde. Die eNOS ist eine membran-assoziierte NOS welche durch Co-Translation N-Myristoylisierung und Post-Translation Cystein-Palmitoylisierung modifiziert wird (Liu et al., 1996). Diese beiden Acetylierungen sind wichtig für die Golgi-Assoziation und die Plasmaeinstülpung der eNOS. Die eNOS ist hauptsächlich in den Caveoli, kleinen Einstülpungen der Plasmamembran, lokalisiert. Die Lokalisation der eNOS wird je nach Zelltyp über verschiedene Isoformen (Caveolin-1,-2,-3) des Strukturprotein Caveolin reguliert. Das Strukturprotein Caveolin-1, welches sich zum Teil auch in den HEK 293 Zellen befindet, ist Hauptbestandteil der Caveoli und fungiert als Bindeglied für zahlreiche, an der Signaltransduktion beteiligte, Proteine wie z.B. die eNOS (Anderson, 1993; Lisanti et al., 1993).

Eine verminderte Caveolin-1-Expression führt zur Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin an die eNOS und damit zu deren Aktivierung (Lisanti et al., 1994). Eine Überexpression von Caveolin-1 führt zu einer verminderten eNOS Aktivität und somit zu einer geringeren NO-Synthese (Michel et al., 1997; Garcia-Cardena, et al., 1997). Die Caveolin-eNOS-Komplexe unterliegen einem ständigen  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Kreislauf von Dissoziation bzw. Aktivierung der eNOS und Reassoziierung bzw. Deaktivierung der eNOS. Liu et al. (1996) konnten zeigen, dass die Palmitoylisierung eine wichtige Rolle bei der optimalen Freisetzung von NO aus der Zelle und somit für die Bioverfügbarkeit von NO darstellt. Die Ergebnisse aus dieser Arbeit zeigten, dass eine erhöhte NO-Bioverfügbarkeit, die durch eine Transfektion eines bovinen eNOS-Plasmides in die HEK 293 Zellen (WT-eNOS transfizierte HEK 293 Zellen) hervorgerufen wurde, zu einer signifikant geringeren sGC-mRNA (dreifach) im Vergleich zu den vektor-transfizierten HEK 293 Zellen und den normalen HEK 293 Zellen führte.

Dies korreliert mit den Resultaten aus der Arbeit von Schmidt et al. (2001), die zeigen konnten, dass in eNOS transfizierten Zellen eine ungefähr vierfache Verringerung der sGC-mRNA-Expression gefunden wurde, im Vergleich zu den vektor-transfizierten und normalen HEK 293 Zellen.

Eine erhöhte NO-Verfügbarkeit durch exogenes NO, das in Inkubationsversuchen mit dem NO-Donator DETA/NO zeigte bei den inkubierten HEK 293 Zellen im Vergleich zu den normalen HEK 293 Zellen sowie den vektor-transfizierten HEK Zellen eine signifikante Erniedrigung der Expression der sGC-mRNA. Der sGC-mRNA Gehalt der vektor-transfizierten HEK 293 Zellen und der normalen HEK 293 Zellen war nicht signifikant unterschiedlich. Ähnliche Ergebnisse konnten in der Studie von Ferrero und Torres (2002) an bovinen chromaffinen Zellen, die mit DETA/NO inkubiert wurden, nachgewiesen werden. Eine chronische NO-Exposition führte dazu, dass bovine chromaffine Zellen weniger cGMP produzieren und so die sGC-mRNA und die  $\beta$ 1-Untereinheit der sGC verringern.

Eine erhöhte NO-Verfügbarkeit in den HEK 293 Zellen, sei es durch endogenes NO (mittels eNOS-Transfektion) oder exogenes NO (durch Inkubationsversuche mit DETA/NO), resultiert in einem deutlich geringeren sGC mRNA Gehalt, im Sinne eines Rückkopplungsmechanismus.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde an glatten Muskelzellen der Rattenaorta der Einfluss von NO auf die Proteinexpression sowie die Aktivität der sGC untersucht.

Die Aktivität der sGC wurde an glatten Muskelzellen der Rattenaorta, die für 4 Stunden mit dem NO-Donator SPER/NO inkubiert wurden, gemessen. Es kam bei den unbehandelten glatten Muskelzellen zu einer um fast vierfach erhöhten Aktivität der sGC im Vergleich zu den behandelten Zellen. Eine erhöhte NO-Verfügbarkeit, die durch eine Inkubation mit SPER/NO simuliert wurde, resultierte in einer signifikant erniedrigten Aktivität der sGC.

Der Einfluss von NO auf die Proteinexpression der sGC wurde anhand von Western Blots an Rattenaortenringen in Inkubationsversuchen mit SPER/NO untersucht. Die mit einem Vehikel inkubierten Aortenringe, die zur Kontrolle dienten, zeigten eine höhere sGC-Expression als die Aortenringe, die mit 200  $\mu$ M SPER/NO für 4 Stunden inkubiert wurden. Eine erhöhte NO-Verfügbarkeit, durch eine Inkubation mit dem NO-Donator, SPER/NO, zeigte eine deutliche Erniedrigung der sGC-Proteinexpression.

Ob die Reduktion der Expression der sGC möglicherweise durch einen Rückkopplungsmechanismus alleine ausgelöst wurde oder ob andere wie z.B. transkriptions-, translations- und transduktionsabhängige Mechanismen eine zusätzliche Rolle spielen, kann auf der Grundlage der bestehenden Daten nicht entschieden werden.

Eine Erhöhung der NO-Verfügbarkeit durch eine Behandlung mit einem NO-Donator (SPER/NO) führt zu einer verringerten sGC-Proteinexpression sowie zu einer verminderten sGC-Aktivität.

Die Ergebnisse aus dieser Arbeit durchgeführt an HEK 293 Zellen sowie an glatten Muskelzellen der Rattenaorta lassen auf einen Rückkopplungsmechanismus in der Regulation der sGC durch NO auf mRNA-, Protein-Ebene sowie bei der Aktivität der sGC schließen. Es könnte also *in vitro* eine Art negativer Rückkopplungsmechanismus existieren, in welchem NO als Signalmolekül agiert und die sGC-Expression reguliert. Ähnliche Resultate konnte Filippov et al. (1997) an glatten Muskelzellen der Rattenpulmonalarterie nach NO-Gabe zeigen. An glatten Muskelzellen der Pulmonalarterie von Ratten wurden die Aktivität der sGC, die Protein-Expression und der mRNA-Gehalt der sGC nach Behandlung von NO-Donatoren wie Natrium-Nitroprussid (SNP) oder S-Nitro-Glutathion (GSNO) gemessen. Eine Inkubation der Muskelzellen mit NO-Donatoren wie SNP ( $\geq 10 \mu\text{M}$ ) oder GSNO ( $\geq 1 \mu\text{M}$ ) bewirkte eine verringerte sGC-mRNA. Die Muskelzellen der Pulmonalarterie von Ratten wurden zunächst mit SNP 1 mM für 4, 8 bzw. 24 Stunden inkubiert. Die Proteinexpression der  $\beta_1$ -Untereinheit der sGC wurde in Western Blots bestimmt. Der Proteingehalt der sGC  $\beta_1$ -Untereinheit verringerte sich kontinuierlich mit der Zunahme der Inkubationsdauer. Die Zellen, die für 24 Stunden mit dem NO-Donator SNP inkubiert wurden, zeigten eine um ca. 10 % niedrige Proteinexpression im Vergleich zu den nicht-inkubierten Zellen. Um den Effekt von SNP auf die Proteinexpression der  $\alpha_1$ -Untereinheit der sGC in den Muskelzellen zu analysieren, wurde in Western Blots ein monoklonaler Antikörper (der sich gegen die  $\alpha_1$ -Untereinheit der sGC richtet) angewandt. Die Proteinexpression der sGC  $\alpha_1$ -Untereinheit in Muskelzellen, welche mit SNP inkubiert wurden, verringerte sich parallel zur Proteinexpression der  $\beta_1$ -Untereinheit der sGC. Um die Effekte einer NO-Behandlung auf die Aktivität der sGC zu zeigen, wurden die Muskelzellen der Rattenpulmonalarterien mit 1mM SNP für 4, 8 sowie 24 Stunden inkubiert. Nach einer 24-stündigen Inkubation mit SNP kam es zu einer um fast 5% erniedrigten sGC-Enzymaktivität im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Eine chronische Exposition der Zellen mit NO-Donatoren verringert die Fähigkeit der Zellen cGMP zu produzieren, was sich in einer verringerten Aktivität der sGC widerspiegelt. Filippov et al. (1997) konnten anhand ihrer Studie zeigen, dass eine längere Behandlung der glatten Muskelzellen der Rattenpulmonalarterien mit NO-Donatoren zu einer Abnahme der sGC-Aktivität sowie zu erniedrigten sGC-mRNA-Levels und sGC-

Protein-Levels führt. Eine chronische NO-Exposition verringert die Aktivität der sGC über eine verminderte Stabilität der mRNAs, welche wiederum von der Proteinsynthese und Gen-Transkription abhängig ist.

Ibarra et al. (2001) zeigten, dass eine Langzeitbehandlung mit dem NO-Donator DETA in pulmonalen Endothelzellen sowohl die sGC-Aktivität als auch die sGC-Proteinexpression verringert. Das gleiche Phänomen wurde auch in Nebennierenzellen beobachtet (Ferrero & Torres, 2002). Ujiie et al (1994) konnten zeigen, dass die sGC-Levels in den Markzellen von Ratten durch eine Inkubation mit dem NO-Donator SNP herunterreguliert werden.

Es stellte sich nun die Frage ob dieser Rückkopplungsmechanismus, der in mehreren *in vitro* -Studien gezeigt werden konnte, auch *in vivo* nachweisbar ist?

In einer Studie von Müller et al. (2003) wurden 10-12 Wochen alten Neuseeländer Kaninchen Isosorbid-Mononitrat (ISMN), ein langwirksames, organisches Nitrat, das durch enzymatische Metabolisierung NO freisetzt, zugefüttert. Über insgesamt 16 Wochen erhielt eine Gruppe der Kaninchen 2 mg/kg KG ISMN (ISMN-2), eine zweite 200 mg/kg KG ISMN (ISMN-200) und eine dritte, die als Kontrolle fungierte, normales Standardfutter. ISMN wurde 2x pro Tag morgens um 8 Uhr und nachmittags um 3 Uhr zum normalen Standardfutter hinzugegeben. Es erfolgte nach dieser 4-monatigen Fütterung mit ISMN eine ISMN-Plasma Bestimmung in den 3 Gruppen vor der letzten ISMN-Gabe sowie 3 Stunden nach der letzten ISMN-Gabe. Es konnte im Vergleich zur Kontrolle in der Gruppe mit ISMN-2 kein signifikanter Unterschied vor bzw. 3 Stunden nach ISMN-Gabe gesehen werden. Jedoch zeigte sich in der Gruppe mit ISMN-200 ein signifikanter Unterschied. Im Vergleich zum Plasmaspiegel vor ISMN-Gabe kam es nach 3 Stunden zu einer 100-fach höheren ISMN-Konzentration. In dieser Gruppe müsste demnach mehr NO verfügbar gewesen sein und so mögliche Auswirkungen auf die Regulation der sGC gezeigt haben.

Falls ein Rückkopplungsmechanismus auch *in vivo* existiert, müsste es demnach bei einer erhöhten NO-Bioverfügbarkeit zu einer verminderten Expression oder Aktivität der sGC kommen.

Stewart konnte erstmals im Jahre 1888 die Entwicklung einer Nitrat-Toleranz unter einer Langzeitbehandlung mit organischen Nitraten (Nitroglycerin) feststellen. Sie bildet sich nachweislich auch bei kontinuierlicher Gabe von Isosorbiddinitrat (ISDN)



oder Isosorbid-5-Mononitrat (IS-5-N) (Kober & Kaltenbach, 1996). Ähnliche Ergebnisse konnten Mülsch et al. (2001) zeigen.

Um festzustellen inwieweit eine verminderte NO-Verfügbarkeit infolge einer eventuell induzierten Nitrattoleranz auftreten kann, wurde die vasorelaxierende Wirkung von ISMN anhand einer Konzentrationswirkungskurve an Kaninchen-Aortaringen der 3 Gruppen (ISMN-2, ISMN-200 sowie Kontrollgruppe) gegenüber dem NO-Donator SNAP gemessen. Müller et al. (2003) konnten zeigen, dass mit steigendem Plasmaspiegel von ISMN es zu einer leicht jedoch nicht signifikanten geringeren Sensitivität gegenüber dem NO-Donor SNAP kam. Die Konzentrationswirkungskurve für SNAP zeigte, dass die Langzeitfütterung mit ISMN nur mit einer geringen Toleranzentwicklung gegenüber NO verbunden ist.

Trotz der geringeren NO-Sensitivität konnte kein signifikanter Unterschied in der Expression der sGC, sowohl für die  $\alpha$ 1- und die  $\beta$ 1-Untereinheit, in den unterschiedlichen Gruppen (ISMN-2, ISMN-200 sowie Kontrollgruppe) gezeigt werden. Bei der Aktivitätsmessung der sGC (Bildung von radiomarkiertem cGMP aus  $^{32}$ P-GTP nach Stimulation mit SNAP) konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrolltieren und den mit ISMN gefütterten Tieren festgestellt werden. Es resultiert, dass sogar eine 200-fache Überdosierung mit ISMN keine Veränderungen der sGC-Expression und –Aktivität bewirkt.

Selbst hohe Konzentrationen von einem NO-Donator wie ISMN scheinen *in vivo* keinen Einfluss auf die sGC-Expression und sGC-Aktivität, im Sinne eines Rückkopplungsmechanismus, zu haben.

Um eventuelle spezies-abhängige oder substanz-abhängige Faktoren auszuschließen, wurde das Experiment der Nitratfütterung in einer Studie der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Kojda (Oppermann et al., 2008) wiederholt. Es wurden jedoch ein anderes organisches Nitrat (Pentaerithrithyltetranitrat (PETN)) und eine andere Spezies (5 Monate alte männliche C57BL/6 Mäuse) verwendet. Über insgesamt 4 Wochen erhielt eine Gruppe der Mäuse 6 mg/kg KG PETN (PETN-6), eine zweite 60 mg/kg KG PETN (PETN-60), eine dritte 300 mg/kg KG PETN (PETN-300) und eine vierte, die als Kontrolle fungierte, erhielt normales Standardfutter (PETN-0). Der sGC-Proteingehalt wurde an Lungenzellhomogenaten der Mäuse mittels Western Blot analysiert. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Expression der sGC in den unterschiedlichen Gruppen (PETN-6, PETN-60, PETN-300 sowie der Kontrollgruppe), sowohl für die  $\alpha$ 1-Untereinheit als auch für die  $\beta$ 1-Untereinheit der sGC. In der gleichen Studie wurde

die Aktivität der sGC aus Lungenzellhomogenaten der Mäuse gemessen; hier konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrolltieren und den mit PETN gefütterten Tieren festgestellt werden. Außerdem zeigten die physiologischen Parameter wie Herzfrequenz und Blutdruck zwischen den Kontrolltieren und den mit PETN gefütterten Tieren keine signifikanten Veränderungen.

Die Resultate dieser Untersuchungen (Fütterungsstudien an Neuseeländischen Kaninchen sowie an C57BL/6 Mäusen) konnten zeigen, dass selbst hohe Konzentrationen an organischen Nitraten wie ISMN oder PETN keinen Effekt auf die sGC-Expression und auf die sGC-Aktivität, im Sinne eines Rückkopplungsmechanismus, *in vivo* haben.

Möglicherweise reicht die NO-Verfügbarkeit durch eine Nitratfütterung nicht aus um *in vivo* den Rückkopplungsmechanismus der sGC durch NO zu zeigen.

Um eine stärkere NO-Verfügbarkeit *in vivo* zu erzielen, wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Kojda ein transgenes Mausmodell erzeugt. Zur Überprüfung der Auswirkungen einer eNOS-Überexpression auf die Regulation der sGC, wurde ein Überexpressionsmodell etabliert. Um eine zellspezifische Überexpression in einem transgenen Mausmodell zu bekommen, ist ein spezifisch genetisches Steuerinstrument (Promotor) erforderlich. Zur Überprüfung dieser Überexpression wurde die eNOS-cDNA in den Tie-2 Promotor kloniert (Suvorova et al., 2005). Über den Tie-2 Promotor konnten mehrere Kolonien transgener eNOS-überexprimierender Mäuse (eNOS ++ ) gezüchtet werden. Die Kolonie mit der höchsten eNOS-Expression, ca. 3,5 fache Erhöhung gegenüber der normalen Expression, wurde für die Studie verwendet. Es zeigte sich bei den eNOS++-Mäusen starke physiologische Veränderungen auf kardiovaskulärer Ebene wie erniedrigter systolischer Blutdruck und erniedrigte Herzfrequenz im Vergleich zu den negativen Geschwistertieren sowie den nicht-transgenen Kontrolltieren. Um zu klären, ob diese Veränderungen in den eNOS++-Mäusen durch die eNOS-Überexpression entstanden sind, wurden den eNOS-überexprimierenden Mäusen während ca. 3-4 Wochen L-NAME (ein NO-Synthase Inhibitor) oral zum Trinkwasser zugefügt. Nach dieser Behandlung verringerte sich der Unterschied zwischen den eNOS-überexprimierenden Mäusen und den Kontrolltieren und verschwand schließlich ganz. Somit scheint der erniedrigte Blutdruck eine Folge der eNOS-Überexpression zu sein.

Fazit der Studie mit den transgenen Mäusen: nach einer Steigerung der endogenen NO-Verfügbarkeit durch die eNOS-Überexpression kam es zu keiner signifikanten Veränderung der Expression beider Untereinheiten der sGC, jedoch zu einem deutlichen Rückgang der sGC-Aktivität (Abstract Oppermann et al., 2006).

Ähnliche Ergebnisse konnte die Arbeitsgruppe von Yamashita et al. (2000) zeigen.

Die Expression der  $\beta$ 1-Untereinheit der sGC zwischen den eNOS-überexprimierenden Mäusen und den Kontrolltieren war nahezu gleich. Die sGC Aktivität der eNOS<sup>++</sup>-Mäuse war jedoch deutlich geringer gegenüber der Aktivität der Kontrolltiere.

In einer Studie von Ohashi et al. (1998) an transgenen eNOS-überexprimierenden Mäusen (eNOS<sup>++</sup>), denen die eNOS in einem preendothelin-1-Promotor kloniert wurde, wurde bei den eNOS<sup>++</sup>-Mäusen ein erniedrigter systolischer Blutdruck festgestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass nach der Behandlung mit L-NAME der Blutdruck sich bei den eNOS<sup>++</sup>-Mäusen normalisiert hat, somit ist die Hypotension eine Folge der eNOS-Überexpression. Die eNOS<sup>++</sup>-Mäuse zeigen eine geringere Vasorelaxation

Falls *in vivo* ein Rückkopplungsmechanismus der sGC durch NO besteht, müsste es demnach bei einer geringen NO-Bioverfügbarkeit bzw. NO-Synthese zu einer deutlichen Erhöhung der sGC-Expression und der sGC-Aktivität kommen.

In einer Studie von Kojda et al. (1999b) wurde anhand von eNOS-„knock-out“- Mäusen der Einfluss verminderter Bioverfügbarkeit von NO durch eine partielle (eNOS<sup>+/-</sup>) oder vollständige (eNOS<sup>-/-</sup>) Deletion des eNOS Gens bei 12-14 Wochen alten Mäusen auf hämodynamische Parameter (wie Blutdruck und Herzfrequenz) und auf die Aktivität der sGC untersucht. Die eNOS<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten eine Hypertonie sowie eine Bradykardie, die eNOS<sup>+/-</sup>-Mäuse waren wie die Kontrolltiere diesbezüglich unauffällig und zeigten einen normalen Blutdruck sowie eine normale Herzfrequenz. Zur Aktivitätsmessung der sGC wurde aus den Lungen der 3 Gruppen eNOS<sup>+/+</sup>, eNOS<sup>+/-</sup> sowie eNOS<sup>-/-</sup> die sGC isoliert. Die Aktivität wurde anhand der Bildung von radiomarkiertem cGMP aus <sup>32</sup>P-GTP nach Stimulation mit SNAP bestimmt. Es zeigten sich keine signifikante Unterschiede zwischen den eNOS-„knock-out“- Mäusen und der Kontrollgruppe. Somit scheint eine partielle Disruption oder komplette Disruption des eNOS Gens nicht mit Veränderungen der sGC-Sensitivität gegenüber NO einherzugehen.

Hussain et al. (1999) konnten in eNOS-„knock-out“- Mäusen eine erhöhte Sensibilität gegenüber NO-Donatoren, jedoch keine Änderung in der sGC-Expression zeigen.

Anhand zahlreicher *in vitro* Studien konnte beobachtet werden, dass Veränderungen in der Bioverfügbarkeit von NO die Expression der sGC regulieren, in Form eines negativen Rückkopplungsmechanismus. Insgesamt sprechen jedoch die Daten der *in vivo* Studien nicht für eine Regulation der sGC durch NO, denn weder eine erhöhte endogene NO-Bioverfügbarkeit (durch Nitratfütterung oder durch eine eNOS-Überexpression) noch eine erniedrigte endogene NO-Konzentration, infolge einer eNOS-Deletion, ließ einen Rückkopplungsmechanismus nachweisen. Somit besteht eine Diskrepanz zwischen den *in vitro* und den *in vivo* gewonnenen Resultaten.

Dieser Widerspruch, könnte durch verschiedene Mechanismen verursacht sein: z.B. durch Unterschiede in der NO-Bioverfügbarkeit, die durch Gen-Manipulationen, wie bei den „knockout“- oder „überexprimierenden“- Tieren entstehen können und die eventuell assoziierten kompensatorischen Veränderungen im NO•-sGC-Signalweg; möglicherweise haben sich die Tiere an die „veränderte“ Situation angepasst oder die Tiere könnten bei den Nitratfütterungsstudien eine Nitrattoleranz entwickelt haben.

Ein weiterer Aspekt: der Rückkopplungsmechanismus scheint nur bei vaskulären NO-Konzentrationen aktiv zu sein. Die hohen bioaktiven Konzentrationen an NO, die in den Nitratfütterungsstudien verwendet wurden (ISM-200 und PETN-300), reichen nicht aus um ein negatives Rückkopplungssignal auf die sGC-Expression auszulösen, das gemäß den bestehenden Ergebnissen aus *in vitro* Studien auftreten soll. Selbst bei den transgenen (eNOS-überexprimierenden) Tieren konnte diese Konzentrationsschwelle nicht erreicht werden, die nötig ist um ein Rückkopplungsmechanismus der sGC zu zeigen.

In dieser Arbeit (*in vitro* Studie) sowie in der Studie von der Arbeitsgruppe Filippov et al. (1997) wurden die Zellen mit mikromolaren NO-Donator-Konzentrationen inkubiert. Es wird angenommen, dass eine Hemmung der sGC-Expression durch NO bei NO-Konzentrationen eintritt, die gewöhnlich die *in vivo* NO-Konzentrationen übersteigt.

*In vivo* bestehen in den normalen, intakten Zellen geringere (nanomolare) NO-Konzentrationen; da *in vivo* solch erhöhte NO-Konzentrationen nie erreicht werden.

In einigen Studien wurde die sGC Regulation anhand der sGC-mRNA und nicht über die sGC-Proteinexpression bestimmt. Man kann nur spekulieren, ob mögliche Veränderungen auf Translations-, Transkriptionsebene oder eine Destabilisierung der mRNA eine Rolle bei der Regulation der Proteinmenge spielen können. Es gibt jedoch nur wenige Studien, die sich mit der Kontrolle der Proteinexpression oder der Degradation der Proteine befassen.

Ein posttranskriptionaler Regulationsmechanismus scheint bei der sGC-Expression durch NO beteiligt sein (Filippov et al., 1997), bei dem eine verminderte Bindung des sGC-mRNA-stabilisierenden Proteins HuR eine Rolle spielen könnte (Kloss et al., 2003).

Ein weiterer interessanter, jedoch noch wenig erforschter Aspekt in der Regulation der sGC scheinen die Protein-Protein Interaktionen zu spielen. Erst vor einigen Jahren wurde das erste sGC-interagierende Protein, Heat shock protein 90 (Hsp90) identifiziert. (Venema et al., 2003). Bis heute ist jedoch wenig über die Rolle des Hsp90 in der Regulation der sGC bekannt.

Ob eventuelle posttranslationelle Mechanismen bei der sGC Regulation eine Rolle spielen scheint noch wesentlich unklar bzw. wenig erforscht.

1993 berichtete die Arbeitsgruppe von Louis, dass Änderungen der sGC-Aktivität über Phosphorylierung des sGC- Enzyms erfolgen. Die Arbeitsgruppe von Ferrero (2000) beobachtete, dass Phosphorylierungen der sGC durch PKG eine Rolle spielen und zeigten eine Aktivitätsminderung der sGC infolge der Phosphorylierung.

Neben der Phosphorylierung scheint die S-Nitrosylierung als posttranslationeller Mechanismus eine wichtige Rolle bei der sGC Regulation zu spielen. Manche NO-Donatoren wie z.B. SNP oder Nitrosothiole wie z.B.: GSNO, produzieren NO in Form eines Kation  $\text{NO}^+$ , welches reversibel mit reaktiven Cysteinen in Proteinen oder Peptiden reagiert (S-Nitrosylierung) (Blaise et al., 2005).

Die reversible Modifikation der Funktion von Zielproteinen wie z.B. Ionenkanäle, Kinasen, Proteasen, oder Transkriptionsfaktoren durch S-Nitrosylierung ist ein Mechanismus, wie NO seine Effekte in den Zellen mediert. Die S-Nitrosylierung von Proteinen und Peptiden ist somit bedeutsam für die intrazelluläre Signaltransduktion. Ignarro und Gruetter (1980) konnten zeigen, dass die S-Nitrosylierung von SH-Gruppen die sGC Aktivität verändern kann. Die S-Nitrosylierung konnte bereits anhand mehrerer Studien in einer Vielzahl von Gewebe und Zelltypen wie z.B. Makrophagen, T-Zellen und Muskelzellen gezeigt werden (Gow et al., 2002; Mannick et al., 1999; Stamler et al., 2001; Sun et al., 2001).

Inwieweit die Inkubationszeit bzw. -dauer mit einem NO-Donator einen möglichen Einfluss auf die Regulation der sGC zu haben scheint, bedarf es noch weiterer Studien. Eine kurze Inkubation (2 h) mit NO-Donatoren verringert die sGC-Aktivität, während eine langfristige (12-24 h) Inkubation zu erniedrigten mRNA- und Proteinlevel führt (Papapetropoulos et al., 1996).

Weiterhin scheint die Wahl des NO-Donators eine Rolle zu spielen. NO-Donatoren weisen unterschiedliche Eigenschaften hinsichtlich ihrer Halbwertszeit oder NO-Speziesfreisetzung auf. Das freigesetzte NO kann als Nitroxylkation (NO<sup>+</sup>), als Nitroxylanion (NO<sup>-</sup>) oder als NO-Radikal (NO<sup>•</sup>) vorliegen. Diazeniumdiolate, die auch in Literatur als NONOate bezeichnet werden, sind NO-Donatoren, die NO spontan freisetzen. NONOate sind Salze, die die anionische NONO Gruppe tragen. Diese Substanzen zerfallen durch Erhöhung der Temperatur oder durch Veränderungen des pH-Wertes ihrer Lösungen; im basischen Milieu sind sie stabil. In wässrigem, neutralem oder saurem Medium setzen sie spontan 2 Moleküle NO<sup>•</sup> frei (Maragos et al., 1991). Auch die S-Nitrosothiole können zur Gruppe der spontan-zerfallenden NO-Donatoren gezählt werden. S-Nitrosothiole zerfallen durch Einwirkung von Übergangsmetallionen wie z.B. Kupfer; sie setzen NO auf reaktivem Wege frei (NO<sup>+</sup>) (Stamler et al.; 1992). Die unterschiedlichen chemischen Eigenschaften der NO-Donatoren wie z.B. die NO-Freisetzung, die Halbwertszeit sowie die möglichen verschiedenen Effekte der freigesetzten Produkte der NO-Donatoren wie NO<sup>•</sup> oder NO<sup>+</sup> müssen bei der Interpretation der Ergebnisse mitberücksichtigt werden. Da NO-Donatoren in unterschiedlicher Geschwindigkeit NO freisetzen, entweder mit sehr geringer oder hoher Geschwindigkeit, ist es sehr schwierig die reale NO-Konzentration vorauszusagen.

Ferner sollte diskutiert werden, dass zusätzliche Mechanismen existieren müssen, die bei der Regulation der sGC eine Rolle spielen. Die sGC-Regulation erfolgt über oxidative Veränderungen der essentiellen Gruppen des Enzyms (Redox-Regulation).

Es wurde in Studien gezeigt, dass Substanzen mit reduzierendem oder oxidierendem Potenzial einen Effekt auf die sGC-Aktivität haben, der vermutlich über Modifizierung von Sulfhydrylgruppen (SH-Gruppen) des Enzyms vermittelt wird (Ignarro et al., 1980; Ignarro and Gruetter, 1980). Da NO und einige seiner Derivate sehr leicht und schnell mit SH-Gruppen reagieren, kann die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, dass auch NO seine Effekte auf sGC zum Teil über Modifizierung der SH-Gruppen ausübt. Andererseits sind Nitrosothiole (Substanzen, die als Produkte in der Reaktion zwischen Thiolen und NO entstehen) auch NO freisetzende Substanzen und sGC-Aktivatoren. Aus diesem Grund ist es sehr schwierig genau zu sagen, ob Thiole ihre Effekte durch eine direkte Wirkung auf sGC ausüben oder Freisetzung und Verfügbarkeit von NO beeinflussen.

Die Aktivität der sGC kann durch verschiedenen Faktoren beeinflusst werden.

Aus zahlreichen Publikationen ist bekannt, dass die sGC-Expression und sGC-Aktivität durch cAMP herunterreguliert wird. (Shimouchi et al., 1993; Papapetropoulos et al., 1995). Papapetropoulos et al. (1995) konnten zeigen, dass erhöhte Konzentrationen an intrazellulärem, zyklischem Adenosin-Monophosphat (cAMP) zu einer geringeren sGC-Aktivität durch erniedrigte mRNA- und Protein-Bildung der sGC-Untereinheiten führen. Der genaue Mechanismus der verringerten Expression der sGC-Untereinheiten durch cAMP ist allerdings noch nicht geklärt.

Störungen in der Expression bzw. Aktivität der sGC scheinen eine wichtige Rolle bei der Pathogenese kardiovaskulärer Krankheiten zu spielen.

Bei der Hypertonie wurde in zahlreichen Studien eine Herunterregulation der sGC beobachtet. Kloss et al. (2000) untersuchten den Einfluss von Alter und chronischem Hypertonus auf die sGC-Expression in Rattenaorten. Hierbei zeigte sich eine signifikante Verminderung der sGC, sowohl auf mRNA- als auch Protein-Ebene, in den älteren Tieren ebenso wie in den hypertensiven Tieren. Ähnliche Ergebnisse bestätigten die Studien von Kojda et al. (1998) und Ruetten et al. (1999), die eine Erniedrigung der sGC-Protein-Levels oder mRNA-Levels beobachteten. Ndisang et al. (2003) zeigten eine Abnahme der sGC-Expression und sGC-Aktivität in Schwanzarterien von 4-8 Wochen alten spontan hypertensiven Ratten. Erniedrigte sGC mRNA-Level wurden in den Zellen der Niere von Desoxycorticosteron (DOCA)-Salz-hypertensiven Ratten beobachtet (Gupta et al., 1997).

Zu einer Hochregulation der sGC-Protein-Levels der sGC-mRNA und der sGC-Enzymaktivität kommt es bei chronischer Hypoxie und Hyperkapnie infolge pulmonaler Hypertension. (Li et al., 1999). In Ratten mit Herzinfarkt wurden erhöhte sGC-Protein-Levels beobachtet (Bauersachs et al., 1999). Die Arbeitsgruppe von Bauersachs untersuchte Ratten, die 8 Wochen nach Ligatur der Herzkranzarterie einen Myokarinfarkt erlitten hatten; hier zeigte sich eine 2,5-fache erhöhte sGC-Expression der  $\beta$ -Untereinheit, während die Aktivität der sGC deutlich erniedrigt war. Bei hypertensiven Ratten war der vasodilatatorische Effekt von SNP auf die sGC-Aktivität deutlich reduziert (Kloss et al., 2000). Auch bei Entzündungen werden Veränderungen in der Regulation der sGC beobachtet. Während der Entzündung steigt der Level des inflammatorischen Zytokins Interleukin-1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) an (Benviste et al., 1995). Takata et al. (2001) konnten zeigen dass in glatten Muskelzellen IL-1 $\beta$  die sGC-Protein -Levels und -mRNA-Levels herunterreguliert.

Bei Inkubationen von einigen Zellreihen mit dem nerve-growth-factor (NGF) (Liu et al., 1997) und mit Zytokinen wie z.B. Interleukine, Lipopolysaccharide (Pedraza et al., 2003) und Endotoxinen (Scott et al., 1998) konnten geringere mRNA-Bildung der sGC-Untereinheiten sowie niedrige Protein-Levels und erniedrigte sGC-Aktivität beobachtet werden.

Faktoren, die Störungen in der sGC-Regulation während verschiedenen kardiovaskulären Krankheiten verursachen, sind noch weitgehend unbekannt. Es wird angenommen, dass veränderte NO-Spiegel und vermehrter oxidativer Stress eine wichtige Rolle bei der Regulation des sGC-Spiegels und der –Aktivität sein können. Krankheiten wie Hypertonie, Hypercholesterinämie, Koronare Herzkrankheit und Diabetes mellitus gehen mit einer mangelnden Produktion bzw. verminderten Bioaktivität von NO einher und es kommt zu einer Einschränkung der endothelabhängigen Relaxation, die auch als „endotheliale Dysfunktion“ bezeichnet wird. Diese „endotheliale Dysfunktion“ ist einer der primären Prozesse auf dem Weg zur Atherosklerose. Zu den bislang diskutierten Faktoren bzw. Mechanismen, die zur Entstehung der „endothelialen Dysfunktion“ führen, zählen eine verminderte Bioverfügbarkeit von NO (Busse & Flemming, 1996), eine Störung der NO-Signaltransduktion sowie die vermehrte Produktion an Superoxid-Radikalen (Harrison, 1997). Ein weiterer denkbarer pathologischer Faktor der „endothelialen Dysfunktion“ wäre der Einfluss von erhöhtem, vaskulärem, oxidativem Stress auf die Gefäßwände (Kojda & Harrison, 1999). Ein intrazelluläres Ungleichgewicht zwischen vermehrt vorhandenen reaktiven Sauerstoffspezies (erhöhte Produktion an Superoxidradikalen) auf der einen Seite und unzureichenden antioxidativen Schutz-Systemen auf der anderen Seite, scheint die Ursache für einen erhöhten oxidativen Stress zu sein.

Bei der Hypertonie müsste es in Folge der geringeren NO-Bioverfügbarkeit zu einer Hochregulation der sGC kommen. Dies ist jedoch nicht der Fall, weswegen angenommen wird, dass die erhöhte Superoxid-Produktion auf die sGC-Expression deutlich stärker ist als die Regulation der sGC durch NO selbst.

Eine verringerte Expression von sGC spielt eine wichtige Rolle in der „endothelialen Dysfunktion“ bei Hypertonie (Bauersachs et al., 1998). Bei Hypercholesterinämie kommt es zu einer Einschränkung der endothelabhängigen Relaxation und zu einer verminderten Bioverfügbarkeit von endogenem NO. Dies führt zu einem deutlichen Anstieg der sGC-Expression, die sGC-Aktivität bleibt jedoch unverändert. Es wird



angenommen, dass es zu einer Überexpression von dysfunktionaler sGC kommt (Laber et al., 2002).

Die lösliche Guanylatzyklase ist sehr oxidationsempfindlich. Demnach scheint sie ein Angriffspunkt für oxidative Veränderungen innerhalb des zellulären Stoffwechsels zu sein, die durch den vaskulären, oxidativen Stress in der Blutgefäßwand ausgelöst werden können. Nicht nur NO, sondern auch andere Oxidanzien können die sGC beeinflussen.

Peroxynitrit (ONOO<sup>-</sup>), das Produkt der Reaktion zwischen NO und O<sub>2</sub><sup>-</sup>, verursacht in den Blutgefäßen eine Verminderung der sGC-Aktivität (Weber et al., 2001). Mayer et al. (1995) konnten zeigen, dass ONOO<sup>-</sup>, über eine Modifikation der essentiellen Aminosäuren, zu einer Inhibition der sGC führt.

Anhand mehrerer Studien scheint es jedoch immer noch unklar ob *in vivo* ein Rückkopplungsmechanismus der sGC durch NO besteht. Es bedarf in Zukunft noch weiterer Studien um den NO/cGMP-Signalweg zu erläutern.

## 5. Zusammenfassung

Ziel dieser Dissertationsarbeit war verschiedene Aspekte des NO•- cGMP-Signaltransduktionsweges zu untersuchen. Dabei wurde das zentrale Enzym, die lösliche Guanylatzyklase (soluble guanylyl cyclase, sGC) sowie deren Aktivierung/Regulation durch Stickstoffmonoxid (NO) näher betrachtet. Die sGC, ein Heterodimer aus einer  $\alpha$ - und einer hämbindenden  $\beta$ -Untereinheit, ist der wichtigste Rezeptor für das gasförmige Signalmolekül NO. NO führt durch Bindung an die prosthetische Hämgruppe der sGC zu deren Aktivierung. Nach Aktivierung der sGC kommt es zur Produktion von zyklischem 3',5'-Guanosinmonophosphat (cGMP), das als intrazelluläres Signaltransduktionsmolekül die Aktivierung von cGMP-abhängigen Proteinkinasen vermittelt. Als eines der Schlüsselenzyme des NO•- cGMP-Signaltransduktionsweges ist sGC in eine Vielzahl physiologischer Prozesse involviert wie z.B. der Vasodilatation. Fehlfunktionen des NO•- cGMP-Signalweges gelten als mögliche Ursache bei kardiovaskulären Erkrankungen. Aus diesem Grund ist man bemüht die Regulationsmechanismen genauer zu identifizieren. Die sGC kann auf der Ebene der Gen-Expression (mRNA und Proteine) sowie auf der Ebene der Aktivität durch NO verändert werden. Zunächst wurde der Einfluss einer Erhöhung der Bioverfügbarkeit von sowohl exogenem als auch endogenem NO auf die Expression und Aktivität der sGC bestimmt.

Die Ergebnisse aus diesen Versuchen lassen einen Rückkopplungsmechanismus der sGC durch NO vermuten und wären somit vergleichbar mit anderen *in vitro* Studien-Resultaten. Bisher konnte jedoch *in vivo* eine erhöhte NO-Bioverfügbarkeit, sei es über eine endogene Erhöhung durch eine funktionale eNOS-Überexpression oder über eine therapeutisch hohe organische Nitratbehandlung, die Expression und die Aktivität der sGC nicht verändern. Dies beruht vermutlich darauf, dass *in vivo* die Konzentration von NO, die für eine hemmende Wirkung auf die Expression der sGC erforderlich ist, nicht erreicht wird,

## 6. Literaturverzeichnis

1. Abu-Soud HM, Loftus M and Stuehr DJ. Subunit dissociation and unfolding of macrophage NO synthase: relationship between enzyme structure, prosthetic group binding and catalytic function. *Biochemistry* 1995;34:11167-11175.
2. Abu-Soud HM and Stuehr DJ. Nitric oxide synthases reveal a role for calmodulin in controlling electron transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:10769-10772.
3. Anderson RG. Caveolae: where incoming and outgoing messengers meet. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90 (23):10909-13.
4. Balla G, Jacob HS, Balla J, Rosenberg M, Nath K, Apple F, Eaton JW and Vercellotti GM. Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J Biol Chem* 1992;267:18148-18153.
5. Bauersach J, Bouloumie A, Fraccarollo D, Hu K, Busse R and Ertl G. Endothelial dysfunction in chronic myocardial infarction despite increased vascular endothelial nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase expression: role of enhanced vascular superoxide production. *Circulation* 1999;100:292-298.
6. Bauersachs J, Bouloumie A, Mülsch A, Wiemer G, Flemming I and Busse R. Vasodilator dysfunction in aged spontaneously hypertensive rats: changes in NO synthase III and soluble guanylyl cyclase expression, and in superoxide anion production. *Cardiovasc Res* 1998;37:772-779.
7. Blaise GA, Gauvin D, Gangal Mund Authier S. Nitric oxide, cell signaling and cell death. *Toxicology* 2002;208(2): 177-92.
8. Benveniste EN, Huneycutt BS, Shrikant P and Ballestas ME. Second messenger systems in the regulation of cytokines and adhesion molecules in the central nervous system. *Brain Behav Immun.* 1995;4:304-14.
9. Benveniste O, Martin M, Villinger F and Dormono D. Techniques for quantification of cytokine mRNAs. *Cytokines Cell Mo Ther* 1998; 4:207-214.
10. Bhagat K and Vallance P. Inducible nitric oxide synthase in the cardiovascular system. *Br Heart* 1996;75:218-220.
11. Birnboim HC and Doly J. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 1979 24;7:1513-23.
12. Bischof G, Serwold TF, Machen TE. Does nitric oxide regulate capacitative Ca influx in HEK 293 cells? *Cell Calcium* 1997;21(2):135-42
13. Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagnano and Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium-channels in vascular smooth muscle cells. *Nature* 1994;368:850-853.
14. Bowen R and Haslam RJ. Effects of nitrovasodilators on platelet cyclic nucleotide levels in rabbit blood; role for cyclic AMP in synergistic inhibition of platelet function by SIN-1 and prostaglandin E1. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991;17:424-433.
15. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
16. Bredt DS, Hwang PM, Glatt EE, Lowenstein E, Reed RR and Snyder SH. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 1991;351:714-718.
17. Bredt DS and Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:682-685.

18. Bredt DS and Synder SH. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:9030-9033.
19. Buechler WA, Kakane M and Murad F. Expression of soluble guanylate cyclase activity requires both enzyme subunits. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;174:351-357.
20. Brüne B, Schmidt KU and Ullrich V. Activation of soluble guanylate cyclase by carbon monoxide and inhibition by superoxide anion. *Eur J Biochem* 1990;192:683-688.
21. Busse R and Flemming I. Endothelial dysfunction in atherosclerosis. *J Vasc Res* 1996;33:181-194.
22. Burnett NW. Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 1981;2:195-2.
23. Bustin, S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 2000;25:169-193.
24. BATTERY LD, Springall DR, CHESTER AH, EVANS TJ, STANDFIELD EN, PARUMS DV, YACOUB MH and POLAK JM. Inducible nitric oxide synthase is present within human atherosclerotic lesions and promotes the formation and activity of peroxynitrite. *Lab Invest* 1996;75:77-85.
25. Chomczynski P and Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-159.
26. Chung SJ & Fung HL. Identification of the subcellular site for nitroglycerin metabolism to nitric oxide in bovine coronary smooth muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1990;253:614-619.
27. Drummond GR, Cai H, Davis ME, Ramasamy S and Harrison DG. Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by hydrogen peroxide. *Circ Res* 2000;86:347-354.
28. Feelish M and Noack E. Correlation between nitric oxide formation during degradation of organic nitrates and activation of soluble guanylate cyclase. *Eur J Pharmacol* 1987;139:19-30.
29. Ferrero R, Rodriguez-Pascual F, Miras-Portugal MT and Torres M. Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase activity inhibition through cyclic CMP-dependent dephosphorylation. *J Neurochem* 2000;75:2029-2039.
30. Ferrero R and Torres MC. Prolonged exposure of chromaffin cells to nitric oxide down-regulates the activity of soluble guanylyl cyclase and corresponding mRNA and protein levels. *BMC Biochem* 12;3:26. Epub 2002 Sep 12
31. Filippov G, Bloch DB, Bloch KD. Nitric oxide decreases stability of mRNAs encoding soluble guanylate cyclase subunits in rat pulmonary artery smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1997;100:942-948.
32. Friebe A and Koesling D. Mechanism of YC-1-induced activation of soluble guanylyl cyclase. *Mol Pharmacol* 1998;53:123-127.
33. Friebe A, Schultz G and Koesling D. Sensitizing soluble guanylyl cyclase to become a highly CO-sensitive enzyme. *EMBO J* 1996;15:6863-6868.
34. Furchgott RF and Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle cells by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373-376.
35. Garbers, D. L., D. Koesling, and G. Schultz. Guanylyl cyclase receptors. *Mol. Biol. Cell* 5: 1-5, 1994.
36. Garcia-Cardena G, Martasek P, Masters BS, Skidd PM, Couet J, LI S, Lisanti MP and Sessa WC. Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo. *J Biol Chem* 1997;272:25437-25440.
37. Gerzer R, Böhme E, Hofmann F and Schultz G. Soluble guanylate cyclase purified from bovine lung contains heme and copper. *FEBS Letter* 1981;132(1):71-74.

38. Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real-time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* 1996;6:995-1001.
39. Gilliland G, Perrin S, Blanchard K, Bunn HF. Analysis of cytokine mRNA and cDNA: detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990;87:2725-2729.
40. Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu, C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* 2001;25:386-401.
41. Gow AJ, Chen Q, Hess DT, Day BJ, Ischiropoulos H and Stamler JS. Basal and stimulated prorelin S-nitrosylation in multiple cell types and tissues. *J Biol Chem* 2002;277, 9637-9640.
42. Gross SS and Wolin MS. Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annu Rev Physiol* 1995;57:737-769.
43. Gupta, GM, Azam L, Yang, and RS Danziger. The b2 subunit inhibits stimulation of the a1/b1 form of soluble guanylyl cyclase by nitric oxide - Potential relevance to regulation of blood pressure. *J.Clin.Invest.* 1997; 100: 1488-1492.
44. Hacker A. Endothelprotektive Eigenschaften von NO-Donatoren bei experimentell ausgelöster Atherosklerose. Diss. rer. nat. 1999, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
45. Haley JE, Dickenson Ah and Schachter M. Electrophysiological evidence for a role of nitric oxide in prolonged chemical nociception in the rat. *Neuropharmacology* 1992; 31: 251-258.
46. Hanahan D. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* 1983;166:557-580.
47. Harrison DG. Cellular and molecular mechanism of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest* 1997;100(9):2153-2157.
48. Harteneck C, Wedel B, Koesling D, Malkewitz J, Böhme E and Schultz G. Molecular cloning and expression of a new  $\alpha$ -subunit of soluble guanylyl cyclase. *FEBS Lett* 1991;292(1,2):217-222.
49. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real-time quantitative PCR. *Genome Res.* 1996;6:986-994.
50. Hein J, Schellenberg U, Bein G, Hackstein H. Quantification of murine IFN-mRNA and protein expression: impact of real-time kinetic RT-PCR using SYBR Green I dye. *Scand. J. Immunol.* 2001;54:285-291.
51. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1991;88:7276-7280.
52. Horowitz A, Menice CB, Laporte R and Morgan KG. Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol Rev* 1996;76:967-1003.
53. Humbert P, Niroomand F, Fischer G, Mayer B, Koesling D, Hinsch KD, Gausepohl H, Frank R, Schultz G and Böhme E. Purification of soluble guanylate cyclase by nitric oxide requires heme. Comparison of heme-deficient, heme-reconstituted and heme-containing forms of soluble guanylate cyclase from bovine lung by a new immunoaffinity chromatographic method. *Eur J Biochem* 1990;190:273-278.
54. Hussain MB, Hobbs AJ, MacAllister RJ. Autoregulation of nitric oxide-soluble guanylate cyclase-cyclic GMP signalling in mouse thoracic aorta. *Br J Pharmacol* 1999;128:1082-1088.
55. Ibarra C, Nedvetsky PI, Gerlach M, Riederer P and Schmidt HH. Regional and age-dependent expression of nitric oxide receptor, soluble guanylate cyclase in the human brain. *Brain Res* 2001; 907(1-2):54-60.

56. Ignarro LJ. Regulation of cytosolic guanyl cyclase by porphyrins and metalloporphyrins. *Advances in Pharmacology* 1994;26:35-65.
57. Ignarro LJ, Barry BK, Gruetter DY, Edwards JC, Ohlstein EH, Gruetter CA and Baricos WH. Guanylate cyclase activation of nitroprusside and nitrosoguanidine is relate to formation of S-nitrosothiol intermediates. *Biochem Biophys Res Commun* 1980; 94(1):93-100.
58. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns KE and Chaudhuri G. Endothelium derived relaxing factor produced and released from arteries and veins is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:9265-9269.
59. Ignarro LJ and Gruetter CA. Requirement of thiols for activation of coronary arterial guanylate cyclase by glyceryl trinitrate and sodium nitrite: possible involvement of S-nitrothiols. *Biochem Biophys Acta* 1980; 631(2):221-231
60. Ignarro LJ, Lipton H, Edwards JC, Baricos WH, Hyman AI, Kadowitz PJ and Gruetter CA. Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: Evidence for the involvement of S-nitrothiols as activate intermediates. *J Pharmacol Exp Ther* 1981;218(3):739-749.
61. Kelm M, Feelisch M, Spahr R, Piper HM, Noack E and Schrader J. Quantitative and kinetic characterization of nitric oxide and EDRF released from cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;154:236-244.
62. Khan BV, Harrison DG, Olbych MT, Alexander RW and Medford RM. Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redoxsensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:9114-9119.
63. Khan MT and Furchgott RF. Additional evidence that endothelium derived relaxing factor is nitric oxide. In: M.J. RAND u. C. RAPER (Hrsg.) 1987: Pharmacology Elsevier, Amsterdam, S. 34
64. Kober G und Kaltenbach M. Nitrate und Nitrat-Toleranz in der Behandlung der koronaren Herzerkrankung 1996; Dr. Dietrich Steinkopff-Verlag, Darmstadt
65. Koesling D. Modulators of soluble guanylyl cyclase. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1998;358:123-126.
66. Koesling D. Studying the structure and regulation of soluble guanylyl cyclase. *Methods* 1999 Dec;19(4):485-93.
67. Koesling D, Böhme E and Schultz G. Guanylyl cyclases, a growing family of signal-transducing enzymes. *FASEB J* 1991;5:2785-2791.
68. Koesling and Friebe. Soluble guanylyl cyclase: structure and regulation. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 1999;135:41-65.
69. Kojda G and Harrison DG. Interactions between NO and reactive oxgen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res* 1999a;43:562-571.
70. Kojda G, Kottenberg K, Hacker A and Noack E. Alterations of the vascular and the myocardial guanylate cyclase/cGMP-system induced by long-term hypertension in rats. *Pharm Acta Helv* 1998; 73(1):27-35.
71. Kojda G, Laursen JB, Ramasamy S, Kent JD, Kurz S, Burchfield J, Shesely EG and Harrison DG. Protein expression, vascular reactivity and soluble guanylate cyclase activity in mice lacking the endothelial nitric oxide synthase: contributions of NOS isoforms to blood pressure and heart rate control. *Cardiovasc Res* 1999b;42:206-213.
72. Kloss S, Bouloumie A and Mulisch A. Aging and chronic hypertension decrease expression of rat aortic soluble guanylyl cyclase. *Hypertension* 2000;35: 43-47.

73. Kloss, S., Furneaux, H., Mulsch, A. Post-transcriptional regulation of soluble guanylyl cyclase expression in rat aorta. *J Biol Chem* 2003;278, 2377-2383.
74. Kröncke K, Fehsel D and Kolb-Bahnhofen V. Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide, a small molecule with complex biological activities. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1995;376:327-343.
75. Kubes P, Suzuki M and Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:4651-4655.
76. Laber U, Kober T, Schmitz V, Schrammer A, Meyer W, Mayer B, Weber M and Kojda G. Effect of hypercholestaemia on expression and function of vascular soluble guanylate cyclase. *Circulation* 2002;105:855-860.
77. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685.
78. Lamas S, Marsden PA, Li GK, Tempst P and Michel T. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of distinct constitutive enzyme isoforms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:6384-6352.
79. Li D, Zhan N and Johns RA. sGC gene expression and localization in rat lung after exposure to hypoxia. *Am J Physiol* 1999; 277: 841-847.
80. Lincoln TM, Komalavilas P, Mac-Millan-Crow LA, Cornwall TL: cGMP signaling through cAMP- and cGMP-dependent protein kinases. *Adv Pharmacol.* 1995;34:305-322
81. Lisanti MP, Scherer PE, Tang ZL, Sargiacomo M Caveolae, caveolin and caveolin-rich membrane domains: a signalling hypothesis. *Trends Cell Biol* 1994;4(7):231-5.
82. Lisanti MP, Tang ZL, Sargiacomo M. Caveolin forms a hetero-oligomeric protein complex that interacts with an apical GPI-linked protein: implications for the biogenesis of caveolae. *J Cell Bio* 1993;123(3):595-604.
83. Liu H, Force T, Bloch KD. Nerve growth factor decreases soluble guanylate cyclase in rat pheochromocytoma PC12 cells. *J Biol Chem.* 1997;272:6038-6043.
84. Liu J, Garcia-Cardena G, Sessa WC. Palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase is necessary for optimal stimulated release of nitric oxide: implications for caveolae localization. *Biochem* 1996;35(41):13277-81
85. Louis JC, Revel MO and Zwiller J. Activation of soluble guanylate cyclase through phosphorylation by protein kinase C in intact PC12 cells. *Biochem Biophys Acta* 2003;1177:299-306.
86. Malinski T, Kapturczak M, Dayharsh J and Bohr D. Nitric oxide synthase activity in genetic hypertension. *Biochem Biophys Res Com* 1993;194(2):654-658.
87. Mannick JB, Hausladen A, Liu L, Hess DT, Zeng M, Miao QX, Kane LS, Grow Aj and Stamler JS. Fas-induced caspase denitrosylation. *Science* 1999;284:651-654.
88. Maragos CM, Morley D, Wink DA, Dunams TM Saavedra JE, Hoffman A, Bove AA, Isaac L, Hrabie JA and Keefer LK. Complexes of NO with nucleophiles as agents for the controlled biological release of nitric oxide. Vasorelaxant effects. *J med Chem* 1991;34:3242-3247.
89. Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem* 1993;268:12231-12234.
90. Mayer B, Schrammel A, Klatt P, Koesling D and Schmidt K. Peroxynitrite-induced accumulation of cyclic GMP in endothelial cells and stimulation of purified soluble guanylyl cyclase. Dependence on glutathione and possible role of S-nitrosation. *J Biol Chem* 1995;270:17355-60.
91. McQuillan LP, Leung GK, Marsden PA, Kostyk SK and Kourembanas S. Hypoxia inhibits expression of eNOS via transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Am J Physiol* 1994;267(5 Pt 2):H1921-7.

92. Michel JB, Feran O, Sase K, Prabhakar P and Michel T. Caveolin versus calmodulin. Counterbalancing allosteric modulators of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1997;272:25907-25912
93. Moncada S and Higgs A. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest* 1991;21:361-374.
94. Moncada S and Higgs A. Mechanisms of disease: the L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993;329:2002-2012.
95. Morley D, Maragos CM, Zhang XY, Boignon M, Wink DA and Keefer LK. Mechanism of vascular relaxation induced by the nitric oxide (NO)/nucleophile complexes, a new class of NO-based vasodilators. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993;21:670-676.
96. Morrison, T.B., Weis, J.J., Wittwer, C.T. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 1998;24:954-8, 960, 962.
97. Müller S, Laber U, Müllenheim J, Meyer W, and Kojda G. Preserved Endothelial Function After Long-Term Eccentric Isosorbide Mononitrate Despite Moderate Nitrate Tolerance. *JACC* 2003;41:1994-2000.
98. Mülsch A, Bauersachs J, Schäfer A, Stasch JP, Kast R and Busse R. Effect of YC-1, an NO-independent, superoxide-sensitive stimulator of soluble guanyl cyclase, on smooth muscle responsiveness to nitrovasodilators. *Br J Pharmacol* 1997;120:681-689.
99. Mülsch A. Effects of in vitro nitroglycerin treatment on activity and expression of the guanyl cyclase and cGMP-dependent protein kinase and their downstream target vasodilator-stimulated phosphoprotein in aorta. *Circulation* 2001;103:2188-2194.
100. Mülsch A, Bassenge E and Busse R. Nitric oxide synthesis in endothelial cytosol: evidence for a calcium-dependent and a calcium-independent mechanism. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1989;340:767-770.
101. Murad F. The 1996 Albert Lasker Medical Research Awards. Signal transduction using nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate. *JAMA* 1996;276:1189-1192.
102. Nakaki T, Nakayama M and Kato R. Inhibition by nitric oxide and nitric oxide-producing vasodilators of DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 1990;189(6):347-53.
103. Nakane M, Arai K, Saheki S, Kuno T, Buechler W and Murad F. Molecular cloning and expression of cDNAs coding for soluble guanylate cyclase from rat lung. *J Biol Chem* 1990;265:16841-16845.
104. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 1992;6:3052-3061.
105. Nathan C and Xie Q. Nitric oxide synthases: Roles, tolls and controls. *Cell* 1994a;78:915-918.
106. Nathan C and Xie Q. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* 1994b;269:13725-13728.
107. Neville DM Jr. Molecular weight determination of protein-dodecyl sulfate complexes by gel electrophoresis in a discontinuous buffer system. *J Biol Chem* 1971;246:6328-6334.
108. Ndisang JF and Wang R. Age-related alterations in soluble guanylate cyclase and cGMP pathway in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2003;21:1117-1124.
109. Nguyen BL, Saitoh M and Ware JA. Interaction of nitric oxide and cGMP with signal transduction in activated platelets. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1991;261:H1043-H1052.
110. Nishida K, Harrison DG, Navas JP, Fischer AA, Dockery SP, Uematsu M, Nerem RM, Alexander RW, and Murphy TJ. Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial nitric oxide synthase. *J Clin Invest* 1992;90:2092-2096.



111. Noack E. Investigation on structure-activity relationship in organic nitrates. *Meth and Find Exptl Clin Pharmacol* 1984;6(10):583-586.
112. Noack E and Feelish M. Molecular mechanisms of nitrovasodilator bioactivation. *Basic Res Cardiol* 1991;86 Suppl 2:37-50.
113. Nussler AK and Billiar TR. Inflammation, immunoregulation and inducible nitric oxide synthase. *J Leukocyte Biol* 1993;54:171-178.
114. O'Dell TJ, Kandel ER and Grant SG. Long-term potentiation in the hippocampus is blocked by tyrosine kinase inhibitors. *Nature* 1991;353:558-560.
115. Ohashi, Y., S. Kawashima, K. Hirata, T. Yamashita, T. Ishida, N. Inoue, T. Sakoda, H. Kurihara, Y. Yazaki, and M. Yokoyama. Hypotension and reduced nitric oxide-elicited vasorelaxation in transgenic mice overexpressing endothelial nitric oxide synthase [see comments]. *J.Clin.Invest.* 1998;102: 2061-2071.
116. Oppermann M, Dao VT, Suvorava T, Bas M and Kojda G. Effect of oral organic nitrates on expression and activity of vascular soluble guanylyl cyclase. *Br J Pharmacol* 2008;3:335-342.
117. Overbergh, L, Giulietti A, Valckx D, Decallonne R, Bouillon R, Mathieu C. The use of real-time reverse transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression. *J. Biomol. Tech.* 2003;14:33-43.
118. Overbergh, L, Valckx D, Waer M, Mathieu C. Quantification of murine cytokine mRNAs using real time quantitative reverse transcriptase PCR. *Cytokine* 1999 Apr;11(4):305-12.
119. Palmer RMJ, Ferrige AG and Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987;327:524-526.
120. Palmer RMJ, Ashton DS and Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988;333:664-666.
121. Papapetropoulos A, Go YC, Murad F, Catravas JD. Mechanism of tolerance to sodium nitroprusside in rat cultured aortic smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 1996;117(1):147-155.
122. Papapetropoulos A, Marczin N, Mora G, Milici A, Murad F and Catravas JD. Regulation of vascular smooth muscle soluble guanylate cyclase activity, mRNA, and protein levels by cAMP-elevating agents. *Hypertension.* 1995;26:696-704.
123. Pedraza CF, Baltrons MA, Heneka MT and Garcia A. Interleukin-1 beta and lipopolysaccharide decrease soluble guanylyl cyclase in brain cells: NO-independent destabilization of protein and NO-dependent decrease of mRNA. *J Neuroimmunol* 2003;144:80-90.
124. Pfeifer A, Klatt P, Massberg S, Ny L, Sausbier M, Hirneiss C, Wang GX, Korth M, Aszodi A, Andersson KE, Krombach F, MAyerhifer A, Ruth P, Fässler R and Hofmann F. Defective smooth muscle regulation in cCMP kinase I –deficient mice. *EMBO J* 1998;17:3045-3051.
125. Pfeiffer S, Mayer B and Hemmes B. Nitric oxide: chemical puzzles posed by a biological messenger. *Angew Chem Int Ed* 1999;38:1714-1731.
126. Pradelles P, Grassi J, Chabardes D and Guiso N. Enzyme immunoassays of adenosine cyclic 3',5'-monophosphate and guanosine cyclic 3',5'-monophosphate using acetylcholinesterase. *Anal Chem* 1989;61:447-53.
127. Robertson BE, Schubert R, Hescheler J, Nelson MT: cGMP-dependent protein kinase activates Ca-activated K channels in cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 1993; 265: C299-C303.

128. Ross R. Mechanisms of disease - Atherosclerosis - An inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-12.
129. Ruetten H. Downregulation of soluble guanylate cyclase in young and aging spontaneously hypertensive rats. *Circ Res* 1999;85:534-541.
130. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985;230:1350-1354.
131. Saiki RK, Gelfand DH, Soffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn, GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988;239:487-491.
132. Sausbier M, Schubert R, Voigt V, Hirneiss C, Pfeifer A, Korth M, Kleppisch T, Ruth P and Hofman F. Mechanisms of NO/cGMP-dependent vasorelaxation. *Circ Res* 2000;87:825-830.
133. Schmidt HHHW, Nau B, Wittfoht W, Gerlach J, Prescher K-E, Klein MM, F. Niroomand F and Böhme E. Arginine is a physiological precursor of endothelium-derived nitric oxide. *Eur J Pharmacol* 1988;154:213-216.
134. Schmidt K, Andrew P, Schrammel A, Groschner K, Schmitz V, Kojda G, Mayer B. Comparison of neuronal and endothelial isoforms of nitric oxide synthase in stably transfected HEK 293 cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281:H2053-H2061.
135. Schröder H & Noack E. Neue Ergebnisse zur thiolabhängigen Aktivierung der Guanylatzyklase durch organische Nitrate. *Z Kardiol* 1986;75 (suppl 3):20-24.
136. Schröder H, Noack E and Müller R. Evidence for correlation between nitric oxide formation by cleavage of organic nitrates and activation of guanylate cyclase. *J Mol Cell Cardiol* 1985; 17: 931-934.
137. Schultz G and Böhme E. Guanylate cyclase. In: Bergmeyer HU, ed. *Methods of Enzymatic Analysis* Weinheim, Germany: Verlag Chemie; 1984:379-389.
138. Schultz KG, Schultz K and Schultz G. Sodium nitroprusside and other smooth muscle-relaxants increase cyclic GMP levels in rat ductus deferens. *Nature* 1977;265:750-751
139. Schulz S, Yuen PST and Garbers DL. The expanding family of guanylyl cyclases. *TIPS* 1991;12:116-120.
140. Scott-Burden T, Elizondo E, Ge T, Boulanger CM and Vanhoutte PM. Growth factor regulation of interleukin-1 beta-induced nitric oxide synthase and GTP: cyclohydrolase expression in cultured smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;196(3):1261-6.
141. Scott, W. S. and D. K. Nakayama. Escherichia coli lipopolysaccharide downregulates soluble guanylate cyclase in pulmonary artery smooth muscle. *J.Surg.Res.* 1998;80: 309-314. .
142. Shimouchi A, Janssens SP, Bloch DB, Zapol WM and Bloch KD. cAMP regulates soluble guanylate cyclase b1-subunit gene expression in RFL-6 rat fetal lung fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1993;265:L456-L461.
143. Sessa WC, Garcia-Cardena G, Liu J, Keh A, Pollock JS, Bradley J, Thiru S, Braverman IM and Desai KM. The Golgi association of endothelial nitric oxide synthase is necessary for the efficient synthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* 1995;270(30):17641-17644.
144. Smolenski A, Bachmann C, Reinhard K, Hoenig-Liedl P, Jarchau T, Hoschuetzky H and Walter U. Analysis and regulation of vasodilator-stimulated phosphoprotein seine 239 phosphorylation in vitro and in intact cells using a phosphospecific monoclonal antibody. *J Biol Chem* 1998; 273:20029-20035.
145. Soderling SH and Beavo JA. Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions. *Curr Opin Cell Biol* 2000;12:174-179.

146. Stamler JS, Lamas S and Fang FC. Nitrosylation, the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* 2001;106:675-683.
147. Stamler JS, Simon DI, Osborne JA, Mullins ME, Jaraki O, Michel T, Singel DJ and Loscalzo J. S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:444-448.
148. Stone JR and Marletta MA. Heme stoichiometry of heterodimeric soluble guanylate cyclase. *Biochem* 1995;34:14668-14674.
149. Stuehr DJ and Nathan CF. Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med* 1989;169:1543-1555.
150. Sun J, Xin C, Eu JP, Stamler JS and Meissner G. Cysteine-3635 is responsible for skeletal muscle ryanodine receptor modulation by NO. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:11158-11162.
151. Suvorava T, Lauer N, Kumpf S, Jacob R, Meyer W and Kojda G. Endogenous vascular hydrogen peroxide regulates arteriolar tension in vivo. *Circulation* 2005;112(16):2487-2495.
152. Takata M, Filippov G, Liu H, Ichinose F, Janssens S, Bloch DB and Bloch KD. Cytokines decrease sGC in pulmonary artery smooth muscle cells via NO-dependent and NO-independent mechanisms. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;280(2):272-278.
153. Tan E, Gurjar MV, Sharma RV and Bhalla RC. Estrogen receptor-alpha gene transfer into bovine aortic cells induces eNOS gene expression and inhibits cell migration. *Cardiovasc Res* 1999;43:788-797.
154. Towbin H, Staehelin T and Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76: 4350-4354
155. Tyagi S, Kramer FR. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nature Biotechnology* 1996;14:303-308.
156. Ujiie K, Hogart L, Danziger R, Drewett JG, Yuen PS, Pang IH and Star RA. Homologous and heterologous desensitization of guanylyl cyclase-linked nitric oxide receptor in cultures rat medullary interstitial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;270:761-767.
157. Varshavsky A. The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:12142-12149
158. Venema RC, Vemena VJ, Ju H, Harris MB, Snead C, Jilling T, Dimiropoulou C, Maragoudakis ME and Catravas JD. Novel complexes of guanylate cyclase with heat shock protein 90 and nitric oxide synthase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285(2):669-678.
159. Weber, M, Lauer N, Mulsch A and Kojda, G. The effect of peroxynitrite on the catalytic activity of soluble guanylyl cyclase. *Free Radic Biol Med* 2001;31: 1360-1367.
160. Wedel B, Humbert P, Harteneck C, Foerster J, Malkewitz J, Böhme E, Schultz G and Koesling D. Mutation of His-105 beta 1 subunit yields a nitric oxide-insensitive form of soluble guanylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:2592-2596.
161. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 1997;22(1):131-131,134-38.
162. Wolin MS, Wood KS and Ignarro LJ. Guanylate cyclase from bovine lung. A kinetic analysis of the regulation of the purified soluble enzyme by protoporphyrin IX, heme and nitrosyl-heme. *J Biol Chem* 1982;257:13312-13320.
163. Wu CC, Ko FN, Kuo SC, Lee FY and Teng CM. YC-1 inhibited human platelet aggregation through NO-independent activation of soluble guanylate cyclase. *Br J Pharmacol* 1995;116:1973-1978.

164. Yamashita T, Kawashima S, Ogashi Y, Ozaki M, Rikitake Y, Inoue N, Hirata K, Akita H, Yokoyama M. Mechanisms of reduced nitric oxide/cGMP-mediated vasorelaxation in transgenic mice overexpressing endothelial nitric oxide synthase. *Hypertension* 2000;36:97-102.
165. Yuen PST, Potter LR and Garbers DL. A new form of guanylyl cyclase is preferentially expressed in rat kidney. *Biochemistry* 1990;29:10872-10878.
166. Zabel U, Häusler C, Weeger M and Schmidt HH. Homodimerization of soluble guanylyl cyclase subunits. Dimerization analysis using glutathione s-transferase affinity tag. *J Biol Chem* 1999;274 (26):18149-52.

## **7. Publikation**

Effect of Hypercholesterolemia and of oxidative stress on the nitric oxide-cGMP pathway. François M and Kojda G. *Neurochem Int.* 2004; 45:955-961.

## 8. Lebenslauf

Name: Michèle François

Eltern: Liette François (geb. Walisch)

Jean-Paul François

geboren: 09.06.1978 in Esch/Alzette, Luxemburg

luxemburgische Staatsangehörigkeit

**1984-1990:** Grundschule ( école primaire „Roude Wee“) in Zolwer (Luxemburg)

**1990-1997:** Gymnasium „Lycée classique Hubert Clement“ in Esch/Alzette

**6/1997:** „naturwissenschaftliches Abitur“ (diplôme de fin d'études secondaires/  
section scientifique)

**1997-1998:** Cours universitaire de Luxembourg, in Luxemburg: Beginn des  
Humanmedizinstudiums

**1998-2000:** vorklinisches Medizinstudium an der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf

**8/2000:** Physikum

**2000-2001:** 1. klinischer Studienabschnitt

**8/2001:** 1. Staatsexamen

**2001-2003:** 2. klinischer Studienabschnitt

Sommersemester 2003: Freisemester. Experimentelle Arbeit im Institut für  
Pharmakologie und klinische Pharmakologie der Heinrich-Heine Universität im  
Rahmen der Dissertation

**3/2004:** 2. Staatsexamen

**4/2004:** Beginn des Praktischen Jahres im Evangelischen Krankenhaus in Düsseldorf  
mit dem Wahlfach Radiologie

**11.05 2005:** 3. Staatsexamen

**23.05.2005:** Erteilung der Approbation als Ärztin

**09/2005-08/2007:** Ärztin in Weiterbildung im Allgemeinen Krankenhaus Hagen,  
dermatologische Abteilung unter Leitung von Dr. C. Kingreen

**09/2007-10/2008:** Ärztin in Weiterbildung im Katharinen Hospital Unna,  
Haut-Klinik unter Leitung von Dr. H. J. Böhmer:

Seit **01.11.2008:** Weiterbildungsassistentin in einer dermatologischen  
Gemeinschaftspraxis in Heiligenhaus/Velbert

Wuppertal, Oktober 2009

Michèle François

## **9. Danksagung**

Ich möchte hiermit Herrn Univ.-Prof. Dr. Karsten Schrör, Direktor des Instituts für Pharmakologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, für sein Einverständnis danken die Untersuchungen am oben genannten Institut ausführen zu dürfen.

Ganz besonders möchte ich mich an dieser Stelle bei Herrn Prof. Dr. Georg Kojda bedanken, für die Überlassung des Themas sowie die zahlreichen wertvollen Hinweise sowohl bei der Durchführung der Experimente als auch im Anschluss bei der Darstellung der Ergebnisse.

Herrn Dr. med. Henrik Endt-Knauer sowie Herrn Jean-Paul Façois danke ich ebenfalls ganz besonders für die vorbehaltlose Unterstützung und die zermürende Arbeit, die vorliegende Dissertation nach Rechtschreib- und Grammatikfehlern zu durchsuchen.

Für die stetige Ermunterung diese Arbeit zu beenden, für ihre liebevolle und geduldige Unterstützung danke ich meinem Mann, Henrik sowie meinen Eltern.

Meinen Eltern, Liette und Jean-Paul, danke ich für ihre Unterstützung auf meinem Lebensweg, für den finanziellen und emotionalen Rückhalt nicht nur während des Studiums sowie für die gewährte Chance, den Beruf ergreifen zu können.

# Regulation der Expression der löslichen Guanylatzyklase durch Stickstoffmonoxid

vorgelegt von Michèle François

## Zusammenfassung

Ziel dieser Dissertationsarbeit war verschiedene Aspekte des NO•- cGMP-Signaltransduktionsweges zu untersuchen. Dabei wurde das zentrale Enzym, die lösliche Guanylatzyklase (soluble guanylyl cyclase, sGC) sowie deren Aktivierung/Regulation durch Stickstoffmonoxid (NO) näher betrachtet. Die sGC, ein Heterodimer aus einer  $\alpha$ - und einer hämbindenden  $\beta$ -Untereinheit, ist der wichtigste Rezeptor für das gasförmige Signalmolekül NO. NO führt durch Bindung an die prosthetische Hämgruppe der sGC zu deren Aktivierung. Nach Aktivierung der sGC kommt es zur Produktion von zyklischem 3',5'-Guanosinmonophosphat (cGMP), das als intrazelluläres Signaltransduktionsmolekül die Aktivierung von cGMP-abhängigen Proteinkinasen vermittelt. Als eines der Schlüsselenzyme des NO•- cGMP-Signaltransduktionsweges ist sGC in eine Vielzahl physiologischer Prozesse involviert wie z.B. der Vasodilatation. Fehlfunktionen des NO•- cGMP-Signalweges gelten als mögliche Ursache bei kardiovaskulären Erkrankungen. Aus diesem Grund ist man bemüht die Regulationsmechanismen genauer zu identifizieren. Die sGC kann auf der Ebene der Gen-Expression (mRNA und Proteine) sowie auf der Ebene der Aktivität durch NO verändert werden. Zunächst wurde der Einfluss einer Erhöhung der Bioverfügbarkeit von sowohl exogenem als auch endogenem NO auf die Expression und Aktivität der sGC bestimmt.

Die Ergebnisse aus diesen Versuchen lassen einen Rückkopplungsmechanismus der sGC durch NO vermuten und wären somit vergleichbar mit anderen *in vitro* Studien-Resultaten. Bisher konnte jedoch *in vivo* eine erhöhte NO-Bioverfügbarkeit, sei es über eine endogene Erhöhung durch eine funktionale eNOS-Überexpression oder über eine therapeutisch hohe organische Nitratbehandlung, die Expression und die Aktivität der sGC nicht verändern. Dies beruht vermutlich darauf, dass *in vivo* die Konzentration von NO, die für eine hemmende Wirkung auf die Expression der sGC erforderlich ist, nicht erreicht wird.